

Aus dem Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie
der Freien Universität Berlin

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR KULTIVIERUNG VON RATTENEMBRYONEN

- WHOLE EMBRYO CULTURE -

und

Wirkung von Thallium auf die in vitro-Entwicklung
von Ratterembryonen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Martin Anschütz
aus Nürnberg

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0006

Aus dem Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie
der Freien Universität Berlin

**METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR KULTIVIERUNG VON RATTENEMBRYONEN**

- WHOLE EMBRYO CULTURE -

und

Wirkung von Thallium auf die in vitro-Entwicklung
von Rattenembryonen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Martin Anschütz
aus Nürnberg

Referent : Prof.Dr.D.Neubert

Koreferent : Prof.Dr.M.Vogel

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien
Universität Berlin

Promoviert am : 28.9.1984

Gliederung

	<u>Seite</u>
1. EINLEITUNG	5
1.1. Allgemeine Einführung	5
1.2. Aufgabenstellung	8
2. METHODEN	9
2.1. Tierhaltung	9
2.2. Präparation der Embryonen	10
2.3. Herstellung des Kulturmediums	11
2.3.1. Gewinnung des Humanserums	11
2.3.2. Zusammensetzung des Tyrode-Phosphat Puffers	13
2.3.3. Bereitstellung des Mediums für die Kultur	13
2.4. Kultur im rotierenden Behältnis	14
2.5. Bestimmung des DNA- und Proteingehaltes der Embryonen und ihrer Hüllen	15
2.6. Glukosebestimmung aus dem Medium	18
2.7. Lactatbestimmung aus dem Medium	18
2.8. Fixierung der Embryonen und Vorbereitung für die Mikroskopie	19
3. ANMERKUNGEN ZU DEN METHODEN DER WHOLE EMBRYO CULTURE	20
3.1. Entwicklung der Kulturverfahren der whole embryo culture	20
3.1.1. Whole embryo culture im Uhrglas	20
3.1.2. Whole embryo culture im zirkulierenden Medium	20
3.1.3. Whole embryo culture im rotierenden Behältnis	21
3.2. Kulturmedien der whole embryo culture	23
3.2.1. Plasma-clots	23
3.2.2. Vor- und Nachteile von Rattenserum, Seren verschiedener Tierarten und Humanserum	23
3.2.3. Prinzipielle Nachteile von Serum als Kulturmedium und erste Fortschritte auf der Suche nach einem chemisch definierten Medium für die whole embryo culture	25
3.2.4. Serumherstellung Bedeutung des Zeitpunktes der Zentrifugation des Blutes für die Qualität der Serumzubereitung	27
3.2.5. Serumherstellung Bedeutung der Hitzeinaktivierung des Serums	28
3.2.6. Vorteile des Tyrode-Phosphat Puffers	29
3.3. Begasung	29
3.4. Präparationstechnik	32
3.5. Abschließende Anmerkung zu den Methoden der whole embryo culture	32

	<u>Seite</u>
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN	34
4.1. Vorbemerkung	34
4.2. Makroskopische und mikroskopische Beschreibung der Entwicklung der Rattenembryonen von Tag 10 (5-6 Somiten) bis Tag 12,5 (33-37 Somiten)	36
4.3. Kulturergebnisse	45
4.3.1. In vivo-in vitro-Vergleich der Entwicklung von Rattenembryonen (Tag 10,3) nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3) und 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)	45
4.3.2. In vivo-in vitro-Vergleich des Wachstums von Rattenembryonen (Tag 10,3) nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3) und 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)	48
4.3.3. Diskussion des in vivo-in vitro-Vergleichs	56
4.4. Kulturerfolg	57
4.4.1. Auflistung der Kulturergebnisse bei der Anzüchtung 10,3 Tage alter Rattenembryonen über 24 Stunden und 48 Stunden	57
4.4.2. Diskussion des Kulturerfolges	61
4.5. Stoffwechsel der Embryonen in Kultur	63
4.5.1. Glukoseverbrauch und Lactatbildung während 24- und 48-stündiger Kultur 10,3 Tage alter Rattenembryonen	63
4.5.2. Diskussion des Glukoseverbrauchs und der Lactatbildung	66
4.6. Die in vitro-Entwicklung der Somitenzahl bei Rattenembryonen in Abhängigkeit von den angelegten Somiten zu Kulturbeginn	69
5. EINFLUSS VON THALLIUM AUF DIE IN VITRO-ENTWICKLUNG VON RATTENEMBRYONEN	74
5.1. Einleitung	74
5.1.1. Allgemeine Einführung	74
5.1.2. Fragestellung der Thalliumversuche	75
5.2. Methoden	76
5.3. Ergebnisse	76
5.3.1. Vorbemerkung	76
5.3.2. Ergebnisse nach 24 Stunden Kultur	77
5.3.3. Ergebnisse nach 48 Stunden Kultur	81
5.4. Diskussion der Ergebnisse	93
6. ZUSAMMENFASSUNG	96
7. LITERATURVERZEICHNUNG	98

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Einführung

Die Entwicklung der Säugetierfrucht läßt sich in drei Phasen einteilen :
die Präimplantationsphase,
die Embryonalphase und
die Fetalperiode.

Die Präimplantationsphase erstreckt sich von der Befruchtung über die ersten Furchungen und Teilungen der Zygote zur Morula bis zum Blastocystenstadium.

Die Embryonalperiode beginnt mit der Implantation der Blastocyste. Kennzeichnend für die Embryonalperiode ist die Organogenese, in der es nach einer Phase der Zellvermehrung durch spezifische Differenzierung einiger Zellen zur Anlage und morphologischen Ausgestaltung der Organstrukturen kommt (WESSELS, 1968).

Zur Embryonalperiode gehört auch der Aufbau und die vollständige Ausdifferenzierung der Placenta.

In die Zeit der Fetalperiode fällt das Wachstum und die Ausreifung der einzelnen, fertig angelegten Organstrukturen. Die Fetalperiode endet mit der Geburt.

Im Laufe der letzten Jahre sind Kultursysteme entwickelt worden, die in der Lage sind, Abschnitte dieser Entwicklungsphasen unter in vitro-Bedingungen nachzuvollziehen. Hierzu gehören die Kulturen embryonaler oder fetaler Zellen, Gewebe und Organe sowie die Anzüchtung von Prä- und Postimplantationsstadien (whole embryo culture).

Der gemeinsame Vorteil dieser Kultursysteme liegt darin, daß begrenzte Entwicklungsabschnitte während der Embryonal- und Fetalperiode unter kontrollierten Bedingungen nachvollzogen und untersucht werden können.

Anwendung finden die Kultursysteme bei der Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Embryonalentwicklung und ihrer Störungen (NEUBERT and BARRACH, 1977a, b).

Für Rasteruntersuchungen (screening) auf schädigende Einflüsse während der pränatalen Entwicklung eignen sich die Kultursysteme weniger. Hier sind die umfassenderen und weniger speziell ausgerichteten in vivo-Tests den Kultursystemen überlegen (NEUBERT, 1981).

Mit der whole embryo culture können die Präimplantationsphase und große Teile der Embryonalentwicklung unter in vitro-Bedingungen nachgeahmt werden. Wesentliche Markierungspunkte während dieser beiden Phasen sind die Implantation und die Placentation. Die Möglichkeiten der whole embryo culture werden durch diese beiden Ereignisse stark eingeschränkt. In der Regel gelingt es nicht, Implantation und Placentation unter in vitro-Bedingungen nachzuvollziehen.

HSU (1979, 1980, 1981) beschreibt die sehr aufwendige Kultur von Mäuseblastocysten über die Implantation hinaus in das Stadium der Organogenese; NEW et al. (1976) züchten 9,5 Tage alte Rattenembryonen über die Placentation bis zum Tag 13,5. Beide Ergebnisse haben den Nachteil, daß nur ein Anteil von annähernd 10 % der ursprünglich in die Kultur gegebenen Präimplantationsstadien bzw. Embryonen die beschriebenen Endstadien erreichen. Kulturen mit solchen Erfolgsraten sind für die Untersuchung embryotoxischer Einflüsse wenig geeignet.

Man muß sich zur Zeit damit abfinden, daß es eine jeweils selbständige whole embryo culture für das Präimplantationsstadium, für die Zeit von der Implantation bis zur Placentation und für die Zeit nach der Placentation gibt.

Beurteilt man die drei möglichen Kulturstadien der whole embryo culture nach ihrer Anwendbarkeit für die Untersuchung embryotoxischer Effekte, so kommt der Kultur von Präimplantationsstadien wenig Bedeutung zu. Diese Phase hat sich - hinsichtlich der Induktion von Mißbildungen - als wenig empfindlich gegenüber toxischen Verbindungen herausgestellt (AUSTIN, 1973; ROTTER, 1978).

Die Kultur von Rattenembryonen nach ihrer Placentation beschreibt COCKROFT (1975):

12,5 Tage alte Rattenembryonen können für 42 Stunden in Kultur gehalten werden; ein hinreichendes Wachstum zeigen aber diese Embryonen nur für

die ersten 24 Stunden. Eine 24stündige Kultur reicht bei Embryonen dieses Stadiums nicht mehr aus, um embryotoxische Einflüsse sichtbar zu machen.

Die Kultivierung von Rattenembryonen nach ihrer Implantation hat Bedeutung für die Erkennung und Untersuchung embryotoxischer Effekte; in diese Zeit fällt die empfindliche Phase der Organogenese.

Bei der Ratte findet die Implantation - der Tag der Befruchtung als Tag 0 gerechnet - am Tag 7,5-8,5 statt. Der früheste Zeitpunkt, zu dem bei Rattenembryonen die Embryonalperiode in einer whole embryo culture nachvollziehbar ist, liegt bei Tag 8 (MORRIS and STEELE, 1977; STEELE and NEW, 1974),

Bewährt hat sich die Kultur 9,5 Tage alter Rattenembryonen über 48 Stunden bis Tag 11,5. An Embryonen dieses Stadiums sind embryotoxische Effekte hervorgerufen durch

Avertin (KAUFMANN and STEELE, 1976)

Äthanol (BROWN et al., 1979)

alpha-Propylvaleriansäure (KAO et al., 1981) und

Jervin (SIM et al., 1983)

beschrieben worden. Störungen der in vitro-Entwicklung der Ratte von Tag 10 auf Tag 11 durch Substanzen wie

Streptozotocin (DEUCHAR, 1978)

Cyclophosphamid (FANTEL et al., 1979) und

Cyclophosphamidmetabolite (MIRKES et al., 1981)

sind untersucht worden.

Für die whole embryo culture im Stadium der Organogenese sind neben Rattenembryonen auch Embryonen anderer Species - wie z.B. der Maus (CLARKSON et al., 1969), des Hamsters (GIVELBER and DIPAOLO, 1968) oder der Beutelratte (NEW and MIZELL, 1972) - erfolgreich eingesetzt worden.

1.2. Aufgabenstellung der Arbeit

Unser Labor hat langjährige Erfahrung mit der Anzüchtung isolierter embryonaler Extremitätenanlagen - sogenannter limb buds -; an einer whole embryo culture hatte unser Labor noch nicht gearbeitet. Somit bestand die Aufgabe darin, in Anlehnung an beschriebene Kulturmethoden (NEW, 1966; COCKROFT, 1977), erste Erfahrungen mit der whole embryo culture zu sammeln. Es sollten in vitro-Bedingungen erarbeitet werden, um 10,3 Tage alte Rattenembryonen für 24 Stunden und 48 Stunden kultivieren zu können.

Zahlreich sind die Veröffentlichungen, die nach Zusatz von toxischen Substanzen zum Kulturmedium von Effekten an den in vitro gewachsenen Embryonen berichten. Solchen Versuchen sollte eine genaue Beschreibung der Kultur und ihrer Ergebnisse vorangehen.

Bestimmungen des DNA- und Proteingehaltes sowie makroskopische und mikroskopische Untersuchungen erlauben einen in vivo - in vitro-Vergleich von Wachstum und Entwicklung der Embryonen. Die morphologische Untersuchung der Embryonen ermöglicht uns, alle Organanlagen zu kennen, die während der Kulturdauer angelegt werden, eine Entwicklung durchmachen und deren Differenzierung gegebenenfalls gestört werden kann.

Um den Stoffwechsel der Embryonen in Kultur einschätzen zu können, wurden der Glukoseverbrauch und die Lactatbildung der Embryonen im Medium gemessen und mit dem Protein- und DNA-Gehalt der in vitro gewachsenen Embryonen in Beziehung gesetzt.

Nach Entwicklung und Beschreibung der whole embryo culture wurde der Einfluß des Schwermetalls Thallium auf die in vitro-Entwicklung der Rattenembryonen untersucht.

2. METHODEN

2.1. Tierhaltung

Für die Kulturen wurden Wistar-Ratten verwendet.

Das Gewicht der Muttertiere lag zwischen 180g und 250g. Die Ratten wurden in Macrolon^R-Käfigen bei 24 Grad Celsius und 50 % Luftfeuchtigkeit in Gruppen von 5-10 Tieren gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter (Altromin^R) und Leitungswasser.

Die Ratte besitzt einen Zyklus mit einer Dauer zwischen 3-6 Tagen. Der sogenannte Östrus, das ist die Zeit der Ovulation und Kohabitation, beträgt annähernd 20 Stunden. Die Ovulation erfolgt normalerweise nachts. Da die hormonale Steuerung durch Licht erfolgt, kann der Ovulationstermin durch Dauerbelichtung verschoben werden.

Mit Hilfe eines gegenüber der normalen Tag-Nacht-Zeit verschobenen Hell-Dunkel-Rhythmus' gelingt es, den Ovulationstermin in die frühen Morgenstunden zu verlegen.

Zwei Stunden vor Beendigung der Dunkelperiode von 6-8 Uhr wurden jeweils durchschnittlich 6 Weibchen mit einem Bock zusammengebracht.

Durch Vaginalabstrich und Auffinden eines Vaginalpfropfes wurde festgestellt, ob eine Paarung stattgefunden hat. Die auf die Paarung folgenden 24 Stunden werden als Tag 0 der Schwangerschaft bezeichnet. Die normale Graviditätsdauer bei der Ratte bis zur Geburt beträgt 21-22 Tage.

Die Schwangerschaftsraten der Ratten während der Versuche für die vorliegende Arbeit waren leider sehr schwankend. Sie lagen zwischen 10 % und 85 %. Die Anzahl der Embryonen je Uterusschleife betrug zwischen 5 und 12 Embryonen. Durch die sehr wechselhaften Schwangerschaftsraten war es schwierig, die Versuche vorzubereiten, da man im voraus nie wußte, mit wieviel Embryonen zu rechnen war. Aus 10 als schwanger deklarierten Ratten konnten je nach Schwangerschaftsrate zwischen 5 und 80 Embryonen für die Kultur präpariert werden.

2.2. Präparation der Embryonen

Die schwangeren Tiere wurden am Tag 10 zwischen 15 Uhr und 16 Uhr - das entspricht Tag 10,3 - durch Dekapitierung mit einer Guillotine getötet. Auf die einfachere Tötung der Ratten durch ein Narkotikum wurde verzichtet. Bei dieser Methode wäre man Gefahr gelaufen, die zu untersuchenden Embryonen bereits ungewollt einer möglicherweise teratogenen Noxe auszusetzen.

Nach Desinfektion des Fells mit 70 %-igem Alkohol wurde der Bauch der Ratte bis zum Rippenbogen mit einer sterilisierten Schere geöffnet.

Die Uterusschleife wurde mit sterilisierter Schere und Pinzette aus ihren Mesenterialansätzen gelöst. Bei der Heraustrennung der Uterusschleife erwies es sich für die weitere Präparation als günstig, möglichst alles Fett am Mesenterialansatz zu belassen.

Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten von jetzt an unter sterilen Bedingungen in einem laminar flow Gerät.

Die Uterusschleife wurde in eine bereits vorbereitete Petrischale mit sterilem Tyrode Phosphat-Puffer gegeben. Unter einer Stereolupe wurde mit Hilfe zweier spitzer Pinzetten die Uterusschleife an der dem Mesenterialansatz gegenüberliegenden Stelle aufgerissen. Dieser Arbeitsgang erfordert etwas Fingerspitzengefühl, da einerseits unter Kraftaufwand das derbe Bindegewebe der äußeren Uterusschicht zerrissen werden muß, andererseits die Spannung innerhalb des Uterus nicht so stark ansteigen darf, daß der nur von zarten Membranen umgebene Eizylinder platzt.

Im Anschluß an diesen Arbeitsschritt wurden die Embryonen mit einem scharfen Skalpell aus dem geöffneten Uterusschlauch herausgeschält. Hatte man vorher den Uterus sorgfältig geöffnet, so war dieser Arbeitsgang sehr problemlos.

Um die Gefahr der Verschleppung einzelner Keime in die Kultur zu verringern, bewährte es sich, die soweit präparierten Embryonen in eine neue Petrischale mit sterilem Tyrode Phosphat-Puffer zu überführen.

Die in ihrer Konsistenz an einen fest zusammengepreßten Wattebausch erinnernde Decidua ließ sich mit Hilfe zweier sehr scharfer und spitzer Pinzetten von den Eizylindern abschälen. Hierzu stach man an der Stelle mit beiden Pinzetten in die Decidua ein, an der die Decidua mit dem Uterus bis zuletzt verbunden war. Durch gleichmäßigen Zug mit beiden Pinzetten ließ sich die Decidua von den Eizylindern lösen.

Im Anschluß daran war nur noch die Reichertsche Membran zu öffnen, bevor die Embryonen in Kultur gegeben werden konnten. Hierzu mußte die Membran ohne Verletzung anderer Strukturen mit der Pinzette gefaßt und vorsichtig aufgerissen werden.

Die Überführung der präparierten Embryonen in das Kulturbedeßnis kann auf verschiedene Weise erfolgen. Mit sehr ruhiger und geübter Hand gelang es, einen Tropfen Präparationsmedium zwischen den gebogenen Enden einer Uhrmacherpinzette "aufzuspannen" und in diesem Tropfen den Embryo zu transportieren. Einfacher war es, die präparierten Embryonen unter sterilen Bedingungen in eine Pipette aufzusaugen und aus der Pipette heraus in das Kulturmedium gleiten zu lassen.

2.3. Herstellung des Kulturmediums

Das Kulturmedium der hier beschriebenen whole embryo culture setzt sich aus Humanserum und einem eigens für unsere Bedürfnisse entwickelten Tyrode Phosphat-Puffer in einem Mischungsverhältnis von drei Teilen Humanserum und einem Teil Puffer zusammen.

2.3.1. Gewinnung des Humanserums

Als Blutspender standen unserem Labor 8 gesunde Spender (4 Frauen und 4 Männer) zur Verfügung. Jedem Spender wurden im Rahmen einer Blutentnahme zwischen 300ml und 400ml Blut entnommen.

Nach Punktierung einer Cubitalvene mit einem "butterfly" (14-G-Nadel) wurde das Blut in jeweils 100ml fassenden sterilisierten Zentrifugengläsern aufgefangen und sofort bei 3000 Umdrehungen/Minute für zehn Minuten

zentrifugiert. Da noch nicht geronnenes Blut zentrifugiert wurde, bildete sich im Überstand ein Fibringerinsel, das noch zahlreiche korpuskuläre Bestandteile des Blutes einschloß.

Dieses Fibringerinsel wurde mit einer sterilen Schere zerschnitten (ca. 10 Scherenschläge), und nach nochmaliger Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen/Minute für 10 Minuten konnte das klare, gelblich gefärbte Serum von den sedimentierten Blutzellen und dem Fibringerinsel dekantiert werden. Das so gewonnene Serum wurde in 40ml-Portionen sterilfiltriert und in 50ml fassende Penicillinflaschen abgefüllt. Nach der Verbördelung der Penicillinflaschen konnten die Serumproben im Wasserbad bei +56 Grad Celsius 30 Minuten lang inaktiviert und nach dem Abkühlen bei -20 Grad Celsius eingefroren werden.

Für die Sterilfiltration wurde die Anlage SM 16 249 der Firma Sartorius, Göttingen, verwendet. Folgende Filter wurden eingelegt: SM 11 307, SM 13 420, SM 11 305, und SM 13 430 der Firma Sartorius, Göttingen.

Bei der Hitzeinaktivierung muß auf einen Punkt besonders geachtet werden: Erst nach luftdichtem Verschuß des Gefäßes darf das Serum auf +56 Grad Celsius erwärmt werden. Inaktiviert man das Serum im offenen Gefäß oder in einem nicht luftdicht schließenden Gefäß, so entweicht ein großer Teil des im Serum gelösten CO_2 und der PH des Serums steigt auf Werte um 8,0. Bei einem PH von 8 sind viele Bestandteile des Serums, die unter Umständen wichtig für ein Wachstum der Embryonen sind, instabil.

Bei -20 Grad Celsius hält sich das Serum problemlos für wenigstens 2 Monate. Nach unseren Erfahrungen schadet auch ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Qualität des Serums nicht.

2.3.2. Zusammensetzung des Tyrode Phosphat-Puffers

Lösung I

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	265 mg
KCl	200 mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	100 mg
NaCl	7000 mg
Glukose	9000 mg
Aqua dest.ad	500 ml

Lösung II

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	500 mg
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1660 mg
Aqua dest. ad	500 ml

Lösung I und II wurden im Verhältnis 1:1 kurz vor Gebrauch gemischt. Eine Aufteilung des Puffers in zwei getrennte Lösungen war erforderlich, da andernfalls nach ca. einwöchiger Lagerung unlösliche Calciumphosphate ausgefallen wären.

Als Präparationsmedium wurde ebenfalls ein Tyrode Phosphat-Puffer verwendet; bei ansonsten gleicher Zusammensetzung wurde zu diesem Zweck anstelle von 9g Glukose nur 3,5g Glukose/l der Lösung I zugesetzt.

2.3.3 Bereitstellung des Mediums für die Kultur

Nach Mischung der Lösung I und II wurde der Puffer sterilfiltriert und zusammen mit dem Serum (6ml Serum und 2ml Puffer) unter sterilen Arbeitsbedingungen in die vorbereiteten sterilisierten Penicillinflaschen gegeben. Die Flaschen wurden verbördelt und für zwei Minuten begast. Zusammensetzung des Gasgemisches :

O_2	-	30 %
N_2	-	65 %
CO_2	-	5 %.

Für die Begasung wurde das sterilfiltrierte Gasgemisch durch eine Kanüle (0,9x33 mm) mit einem Strömungsvolumen von ca. 1,5 l/Min. auf das Medium gegeben.

Durch den auftreffenden Gasstrom wurde das Medium turbulent durchmischt; eine Schaumbildung war allerdings zu vermeiden, da es andernfalls zu einer Denaturierung von Protein gekommen wäre.

2.4. Kultur im rotierenden Behältnis - Rollerkultur -

Im Anschluß an die erste Begasung konnten die Embryonen in das Kulturmedium gegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden prinzipiell drei Embryonen (Tag 10,3) in 8ml Kulturmedium - bestehend aus 6ml Humanserum und 2ml Tyrode Phosphat-Puffer - inkubiert. Als Kulturbehältnisse wurden 50ml fassende Penicillinflaschen verwendet, die mit Kunststoffstopfen verschlossen wurden. Eine Metallverbördelung, die den Kunststoffstopfen fest an die Flaschenöffnung drückt, sicherte den luftdichten Abschluß.

Nach Verschuß der Kulturbehältnisse wurde das Medium ein zweites Mal für 2 Minuten begast. Das Gasgemisch hatte die gleiche Zusammensetzung wie oben beschrieben; es wurde aber nur mit einem Strömungsvolumen von ca. 0,7l/Min. auf das Medium gegeben, da sonst die Embryonen durch den starken Gasstrahl und die Turbulenzen im Medium leicht beschädigt worden wären.

Diente die erste Begasung dazu, das Medium mit dem gewünschten Gasgemisch zu sättigen, so hatte die zweite Begasung allein die Aufgabe, quantitativ alle Luft durch das Gasgemisch im Kulturgefäß zu ersetzen. Nach diesem Vorgehen wurden die Kulturbehältnisse waagrecht liegend in den Inkubator gegeben.

Die Arbeitszeit bis zur Bereitstellung einer Flasche mit drei Embryonen für die Kultur lag bei 15 Minuten. In diesen 15 Minuten ist die Zeit für die Gewinnung des Humanserums nicht enthalten; mitgerechnet sind der erforderliche Zeitaufwand für die Bereitstellung des Mediums und die Begasungszeit, die allein pro Flasche 4 Minuten ausmacht. Nach 2 Stunden und dreißig Minuten standen 10 Flaschen mit insgesamt 30 Embryonen für den Inkubator bereit.

Bei einer Rollergeschwindigkeit von 25 Umdrehungen/Minute und einer stabilen Temperatur von +37 Grad Celsius wurden die Embryonen für 24 Stunden im Inkubator belassen.

Nach 24stündiger Kultur wurde das Gasgemisch in den Kulturbehältnissen durch ein anderes ersetzt : Hierzu wurde ein Gasgemisch aus

O ₂	-	95 %
und		
CO ₂	-	5 %

mit einem Strömungsvolumen von ca. 0,7l/Min. auf die Kultur gegeben.

Nach weiteren 24 Stunden Kultur wurden die Flaschen aus dem Inkubator genommen, geöffnet, Medium und Embryonen in vorgewärmte Petrischalen gegeben und die gewachsenen Embryonen in ihren Hüllen unter der Lupe betrachtet. Prinzipiell wurden die Embryonen auf Herzschlag und Dotterzirkulation untersucht; die Somiten wurden gezählt.

2.5. Bestimmung des DNA- und Proteingehaltes der Embryonen und ihrer Hüllen

Die Embryonen wurden aus ihren Hüllen unter der Lupe herausgelöst und nach zweimaliger Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung in kleinen Eppendorfhütchen bei -20 Grad Celsius eingefroren.

Bei den nur 3mm großen Eizylindern vom Tag 10,3 war eine ausreichend genaue Teilung in Embryo und Hülle nicht möglich. Für eine DNA- oder Proteinbestimmung wurden 3 Eizylinder eingesetzt.

Bei den 11,3 Tage alten Rattenembryonen waren 2 Embryonen bzw. 2 Hüllen für eine Bestimmung erforderlich. Bei Embryonen vom Tag 12,3 reichte 1 Embryo bzw. 1 Hülle für eine Gehaltsbestimmung aus.

Nach Auftauen der Proben wurde für die DNA-Bestimmung jedes Eppendorfhütchen mit 0,9 % NaCl-Lösung auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und der Inhalt homogenisiert; für die Proteinbestimmung wurde das gleiche Volumen 10 % NaOH zugesetzt und homogenisiert. Die Proben für die Proteinbestimmung blieben über mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen.

DNA-Bestimmung

Die 200 µl Homogenisat wurden nach Zusatz von 200 µl 4 %iger Perchlorsäure 10 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 2 % Perchlorsäure gewaschen; dann wurde die DNA aus dem Sediment mit 1ml 5 %iger Perchlorsäure bei 95 Grad Celsius unter Schütteln 15 Minuten lang extrahiert. Man ließ abkühlen und setzte den Überstand in die DNA-Bestimmung nach BURTON (1956) ein.

Zusammensetzung des DNA-Reagenzes :

3g Diphenylamin wurden in ca. 40ml Eisessig gelöst, mit 2,75ml conc. Schwefelsäure versetzt und mit Eisessig auf ein Volumen von 100ml aufgefüllt. Nach Zusatz von 0,5ml verdünntem Acetaldehyd (1:50) blieb der Ansatz vor Gebrauch für mindestens 18 Stunden in Dunkelheit stehen. Die lichtgeschützte Aufbewahrung war erforderlich, um eine Polymerisation des Acetaldehyds zu verhindern.

Extinktionsbereich : 600nm

DNA-Standard :

20mg DNA-Kalbthymus I (Firma Sigma) wurden in 100ml SSC-Puffer gelöst.

SSC-Puffer :

0,15M NaCl-Lösung

0,015M NaCitrat-Lösung (PH : 7,0)

im Verhältnis 1 : 1.

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde im Mikromaßstab nach der Biuret-Methode in dem Enzymautomaten ABA-100 der Firma Abbott (USA) durchgeführt. Hierzu wurden 50µl Homogenisat pro Bestimmung eingesetzt.

Zusammensetzung des Biuret-Reagenzes :

Stammlösung

K Na Tartrat	18g
CuSO ₄	6.0g
0,2N NaOH	ad 1000ml

dann

KJ	10g
0,2N NaOH	ad 2000ml

Vor Gebrauch wurden Stammlösung und 0,9%ige NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt.

Extinktionsbereich : 545nm

Temperatur : 37 Grad Celsius

Verdünnerplatte: 1 : 11

Car revolution : 2

Ausdruck : nach 2 Minuten

Kontrollstandards :

Proteinstandard Abbott

0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g und 4 μ g Protein/ μ l

2.6. Glukosebestimmung aus dem Medium

Die Glukosebestimmung wurde im Mikromaßstab nach der Hexokinase-Methode in dem Enzymautomaten ABA 100 der Firma Abbott (USA) durchgeführt.

20 μ l Medium wurde für jede Einzelbestimmung eingesetzt. Gemessen wurde photometrisch bei 340nm die durch Reduktion aus NAD entstandene Menge an NADH bei gleichzeitiger Oxidation des Glukose-6-Phosphats zu 6-Phosphoglukonat.

Reagenz : a-gent Glukose UV, Abbott

Temperatur : 37 Grad Celsius

Verdünnerplatte: 1 : 101

Car revolution : 2

Ausdruck : nach 5 Minuten

Kontrollseren : Praecinorm, Boehringer (Mannheim)

Wässrige Kontrollösungen: Praeciset, Boehringer (Mannheim)

2.7. Lactatbestimmung aus dem Medium

Die Lactatbestimmung wurde im Mikromaßstab in dem Enzymautomaten ABA-100 der Firma Abbott (USA) durchgeführt.

Für die Lactatbestimmung mußte die zu bestimmende Probe enteiweißt werden. Hierzu wurden 100 μ l Medium mit 200 μ l eiskalter 5%iger Perchlorsäure versetzt; nach fünfminütigem Stehen bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

50 μ l des Überstandes wurden für jede Einzelbestimmung eingesetzt.

Gemessen wurde photometrisch bei 340nm die durch Reduktion aus NAD entstandene Menge an NADH bei gleichzeitiger Oxidation des Lactats zu Pyruvat mit Hilfe der Lactatdehydrogenase.

Temperatur : 37 Grad Celsius

Verdünnerplatte: 1 : 101

Car revolution : 2

Ausdruck : nach 5 Minuten

Reagenz : Testomar Lactat vollenzymatisch, Firma Behring (Marburg)

Kontrollseren : Praecinorm, Boehringer (Mannheim)

Praecipath, Boehringer (Mannheim).

2.8. Fixierung der Embryonen und Vorbereitung für die Mikroskopie

Für die Mikroskopie wurden die Embryonen unmittelbar im Anschluß an die Kultur aus ihren Hüllen herausgenommen und nach zweifacher Spülung mit 0,9%iger NaCl-Lösung in ein Fixationsmedium gegeben.

Für die Anfertigung der 5µm dicken Serienschnitte wurden die Embryonen in Bouin'scher Lösung fixiert und in Paraplast eingebettet. Die fertigen Schnitte wurden mit Haematoxylin-eosin angefärbt und mit Eukit eingedeckt.

Für die 1µm dicken Schnitte wurden die Embryonen in eine Mischung aus 3% Glutaraldehyd und 3% Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer (PH=7,2) gegeben und mit 1%igem OsO_4 in Cacodylatpuffer nachfixiert.

Für die Schnitte wurden die so vorbereiteten Embryonen in Mikropal (Ferak) eingebettet. Die 1µm dicken Schnitte wurden mit alkalischer Giemsa-Lösung angefärbt und danach mit Euparal auf dem Objektträger eingedeckt.

3. ANMERKUNGEN ZU DEN METHODEN DER WHOLE EMBRYO CULTURE

3.1. Entwicklung der Kulturverfahren der whole embryo culture

3.1.1. Whole embryo culture im Uhrglas

Die Uhrglaskulturen werden als Methode für die Anzüchtung embryonaler Gewebe beschrieben (FELL and ROBISON, 1929; GROBSTEIN, 1950). NICHOLAS und RUDNICK (1934) sowie JOLLY und LIEURE (1938) machten die ersten Versuche, mit Hilfe dieser Methode ganze Embryonen anzuzüchten. NEW und STEIN (1964) gelang mit Hilfe der Uhrglastechnik die erfolgreiche Kultur von Ratten- und Mäuseembryonen verschiedener Stadien.

Verlassen hat man die Uhrglastechnik in der whole embryo culture inzwischen völlig, da es sich bei dieser Methode um ein statisches Verfahren handelt: Der Embryo liegt in seinem Medium fest an einer Stelle und kann nur die Nährstoffe erreichen, die aus unmittelbarer Nähe herandiffundieren; Stoffwechselprodukte, z.B. Lactat, reichern sich in nächster Umgebung des Embryos an.

3.1.2. Whole embryo culture im zirkulierenden Medium

Um die Nachteile der Uhrglaskulturen zu umgehen, konstruierte NICHOLAS (1938) einen Apparat für die whole embryo culture, in dem das Medium innerhalb eines geschlossenen Kreislafs durch strömendes Gas in Bewegung gehalten wird. Der wachsende Embryo liegt in einer kleinen Kammer, durch die kontinuierlich das mit dem gewünschten Gasgemisch äquilibrierte Medium fließt.

NEW (1967) übernahm von NICHOLAS (1938) das Prinzip des beschriebenen Apparates und verglich die Kulturergebnisse der whole embryo culture im zirkulierenden Medium mit den Ergebnissen der Uhrglastechnik: Hierbei stellte sich heraus, daß das zirkulierende Medium entschieden bessere Kulturerfolge bei der Anzüchtung von 11- und 12 Tage alten Rattenembryonen liefert.

Die whole embryo culture früherer Stadien im zirkulierenden Medium bringt gegenüber der Uhrglastechnik Vorteile hinsichtlich einer gesteigerten Protein- und Somitenbildung. Bei den Weiterentwicklungen des von NEW (1967) beschriebenen Gerätes durch TAMARIN and JONES (1968) sowie ROBKin et al.(1972) wird das Medium nicht mehr durch strömendes Gas, sondern mit Hilfe einer Pumpe durch die Kammern, in denen die Embryonen wachsen, getrieben.

Der Vorteil dieser Entwicklung liegt darin, daß in einem laminar strömenden Medium die Embryonen mechanisch weit weniger beansprucht werden als in einem Medium, das durch einen Gasstrom angetrieben in einem turbulenten Fluß an den Embryonen vorbeiströmt.

Die Kultur im zirkulierenden Medium bietet Vorteile bei der Beantwortung spezieller Fragestellungen, die eine genaue Beobachtung der Embryonen in Kultur verlangen. So gelingt es ROBKin et al.(1974) mit Hilfe einer Lasertechnologie, die Herzfrequenz der Rattenembryonen in Kultur unter Zusatz von beta-Stimulatoren und -Blockern quantitativ zu beobachten.

Der Nachteil einer Embryokultur im zirkulierenden Medium liegt in dem verhältnismäßig großen Aufwand verglichen mit der geringen Zahl an Embryonen, die gleichzeitig kultiviert werden können.

3.1.3. Whole embryo culture im rotierenden Behältnis - sogenannte Rollerulturen -

Erst die Entwicklung der whole embryo culture im rotierenden Behältnis eröffnete die Möglichkeit, innerhalb einer Versuchsserie 30 und mehr Embryonen ohne großen Mehraufwand gleichzeitig in die Kultur geben zu können.

Bei der in vitro-Anzüchtung der Beutelratte (NEW and MIZELL, 1972) sowie bei der Untersuchung der Auswirkung von zugesetzten Dottersackantikörpern auf die in vitro-Entwicklung von Rattenembryonen (NEW and BRENT, 1972) wird diese Kulturmethode erstmals beschrieben. Die Kultur im rotierenden Behältnis ist gleichsam ein Kompromiss zwischen Uhrglastechnik und Kultur im zirkulierenden Medium.

Mit der Uhrglastechnik hat die "Rollerkultur" gemeinsam, daß nicht laufend ein frisches Gasgemisch der Kultur zur Verfügung steht, sondern die Embryonen mit der Gasmenge auskommen müssen, die zu Beginn der Kultur vorgelegt wird bzw. während der Kultur ausgetauscht wird.

Die Kulturen im rotierenden Behältnis und im zirkulierenden Medium sind darin vergleichbar, daß Embryo und Medium bewegt werden. Dadurch kann es zu keiner Nährstoffverarmung bzw. Stoffwechselproduktanreicherung in unmittelbarer Nähe des Embryos kommen. Durch die Drehung des Kulturbedältnisses wird auf Grund der Adhäsionskräfte zwischen Medium und Behältniswand stets eine neue oberste Schicht des Mediums mit dem Gasgemisch in Kontakt gebracht. Hierdurch erreicht man eine hinreichende Sättigung des Mediums mit dem vorgelegten Gasgemisch und kann auf die Durchströmung des Mediums mit dem Gasgemisch verzichten.

Durch Vergleich der Kulturergebnisse im rotierenden Behältnis und im zirkulierenden Medium untersuchten NEW et al.(1973) die Leistungsfähigkeit der whole embryo culture im rotierenden Behältnis :

Bei der Anzüchtung 10,5 Tage alter Rattenembryonen sind nach 24-stündiger Kultur keine Unterschiede hinsichtlich Protein- und Somitenbildung zwischen beiden Kulturmethoden festzustellen. Anders sieht es nach 48-stündiger Kultur aus: Während bei der Kultur im rotierenden Behältnis die Somitenbildung nur um 10% hinter den Ergebnissen der Kultur im zirkulierenden Medium zurückbleibt, liegt die Proteinbildung bei einer Kultur im rotierenden Behältnis nur bei 60% verglichen mit der Proteinbildung im zirkulierenden Medium (100%).

Abschließend kann man sagen, daß trotz einiger Nachteile hinsichtlich der Kulturergebnisse die praktischen Vorteile einer whole embryo culture im rotierenden Gefäß gegenüber einer Kultur im zirkulierenden Medium überwiegen.

3.2. Kulturmedien der whole embryo culture

3.2.1 Plasma-clots

Die plasma-clots werden als Medium für die whole embryo culture im Uhrglas beschrieben (NICHOLAS and RUDNICK, 1934). Auch die Anzucht embryonaler Organe - z.B. limb buds - gelingt auf plasma-clots (FELL and ROBISON, 1929). NEW und STEIN (1964) nahmen diese Technik wieder auf und versuchten auf plasma-clots die Kultivierung von Mäuse- und Rattenembryonen.

Bei den plasma-clots handelt es sich um Gerinsel aus Embryoextrakt und Plasma. Für die Kultivierung von Rattenembryonen verwandten NEW und STEIN (1964) aus Rattenblut gewonnenes Plasma und einen Extrakt aus Rattenembryonen bzw. Hühnchenplasma und einen Extrakt aus Hühnchenembryonen.

Aus den gleichen Gründen, aus denen die Uhrglastechnik heute keine Anwendung mehr in der whole embryo culture findet, hat man auch die plasma-clots als Kulturmedium verlassen: Bei den plasma-clots kommt es zu einer lokalen Verarmung an Nährstoffen und einer Anreicherung an Stoffwechselprodukten in unmittelbarer Nähe des Embryos. Weiterhin sind die plasma-clots sehr aufwendig in ihrer Herstellung und durch ihre an Mystik grenzende Zubereitung völlig zufällig in ihrer Zusammensetzung.

3.2.2. Vor- und Nachteile von Rattenserum, Seren verschiedener Tierarten und Humanserum

Nach den ersten Ansätzen von JOLLY und LIEURE (1939), Rattenembryonen nicht auf plasma-clots, sondern in einem flüssigen, aber noch viskösen plasmahaltigen Medium wachsen zu lassen, nahm NEW (1966) diesen Gedanken auf, und versuchte Rattenembryonen in reinem und flüssigem Rattenserum anzuzüchten. NEW (1966) testete auch zahlreiche Seren anderer Tiere wie Kaninchen, Fohlen, Kalb und Schaf. Im Kaninchenserum starben die Rattenembryonen schon nach zwei Stunden ab, im foetalen Kälberserum war nur eine sehr geringe Entwicklung zu erreichen und in einigen Chargen Fohlenserum war ein mit homologem Rattenserum vergleichbares Wachstum zu erreichen.

Bei der Einschätzung der Ergebnisse ist zu beachten, daß NEW (1966) frisches eigenhergestelltes Rattenserum mit gekauften Seren verschiedener Species verglichen hat. Zweifellos haben von der Industrie gekaufte Seren, die teilweise monatelang lagern bis sie verwendet werden, nicht die Qualität, die Seren haben, die im eigenen Labor gewonnen werden. Weiterhin kann man von gekauften Seren nicht verlangen, daß sie unter derart subtilen Bedingungen erstellt worden sind, wie sie STEELE und NEW (1974) für die Gewinnung von Rattenserum fordern.

Erste Ergebnisse von KRÖGER (1983) in unserem Labor weisen darauf hin, daß frisch gewonnenes Rinderserum eine gute und mit Rattenserum vergleichbare Entwicklung der Rattenembryonen liefert.

Über die Möglichkeit, Humanserum für die whole embryo culture von Rattenembryonen einsetzen zu können, liegen sehr unterschiedliche Meinungen in der Literatur vor. TANIMURA und SHEPARD (1970) können keine Unterschiede im Kulturergebnis bei Verwendung von Humanserum oder Rattenserum finden. Während SHEPARD et al.(1969) und ROBKIN et al.(1972) - ohne besonders darauf einzugehen - Rattenserum durch Humanserum in ihren Kulturen ersetzen, beschreiben CHATOT et al.(1980), daß in Humanserum nur nach Zusatz von Glukose ein adäquates Wachstum der Rattenembryonen in Kultur zu erlangen ist.

BECK (1981) benötigt auch weiterhin neben Glukose einen 10%igen Zusatz von Rattenserum zum Humanserum, um Rattenembryonen kultivieren zu können.

Alle Autoren streben den Ersatz des Rattenserums durch Humanserum an. Es stellt sich die Frage, welche Vorteile Humanserum in der whole embryo culture bietet.

600-800ml Humanserum können problemlos in einem Arbeitsgang aus Spenderblut gewonnen werden; das ist eine ausreichende Menge, um über 300 Rattenembryonen zu kultivieren. Um die gleiche Menge Rattenserum zu erhalten, benötigt man das Blut von wenigstens 120-150 Ratten.

Man kann zwar das Blut der für die Präparation getöteten Tiere für die Serumgewinnung verwenden, dies ist aber aufwendig und bringt organisatio-

rische Probleme mit sich. Einfacher ist es, das Rattenserum im voraus zu erstellen und einzufrieren. Dann aber müssen allein für die Serumherstellung pro Versuchsserie (10 Flaschen mit je 3 Embryonen) nochmals 10-12 Ratten getötet werden, was sehr teuer und mit unserem Ziel, möglichst wenige Tiere durch unsere Versuche sterben zu lassen, unvereinbar ist.

All diese Probleme entfallen beim Arbeiten mit Humanserum.

Ein weiterer Vorteil des Humanserums liegt darin, daß über einen langen Zeitraum (10-13 Versuchsserien) dieselbe Serumcharge eingesetzt werden kann. Während dieser Phase kann man mit einer konstanten Qualität des Serums rechnen. Mögliche Verschiebungen im Kulturerfolg (vgl. S.60) während eines solchen Zeitraums sind dann mit Sicherheit nicht auf eine veränderte Qualität des Serums zurückzuführen.

Außer diesen beiden Vorteilen bietet Humanserum gegenüber Rattenserum als Medium in der whole embryo culture keine weiteren Vorzüge, da es sich in beiden Fällen um in ihrer Zusammensetzung schwankende und chemisch nicht definierte Medien handelt.

3.2.3 Prinzipielle Nachteile von Serum als Kulturmedium und erste Fortschritte auf der Suche nach einem chemisch definierten Medium für die whole embryo culture

Ein wesentliches Problem bei der whole embryo culture ist die Tatsache, nicht jederzeit mit voll reproduzierbaren Kulturergebnissen rechnen zu können. Letztlich muß der Fall einkalkuliert werden, daß zeitweise keine oder so gut wie keine in vitro-Entwicklung der Rattenembryonen zu erreichen ist (vgl. Tab.4.4.1, S.60).

Aufgrund der vielen Variablen kann in einer solchen Situation die Fehler- oder Ursachensuche nur auf Spekulationen beruhen: Sind die äußeren Kulturbedingungen wie z.B. Temperatur, Rollergeschwindigkeit oder PH des Präparationsmediums noch verhältnismäßig leicht zu überprüfen, so kann über die Qualität des Serums überhaupt keine Aussage getroffen werden.

Schon in einer der ersten Arbeiten über die whole embryo culture geht NICHOLAS (1938) auf dieses Problem ein und drückt seine Verwunderung

aus, daß es überhaupt möglich ist, bei Verwendung von Serum einigermaßen reproduzierbare Kulturergebnisse zu erhalten.

Bei Serum handelt es sich um ein Medium, das weder chemisch definierbar noch standardisierbar ist; Seren desselben Spenders, zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen, differieren in ihrer Zusammensetzung.

Ein wesentlicher Fortschritt auf dem Gebiet der whole embryo culture wäre es, gelänge ein Austausch des Serums durch ein chemisch definiertes Medium.

Die Versuche von CLARKSON et al. (1969), COCKROFT (1977) und GIVELBER and DiPAOLO (1968), einen Teil des Serums durch in ihrer Zusammensetzung definierte Lösungen (z.B. Waymouth's MB 752/1 oder Tyrode Puffer) zu ersetzen, bringen eine Ersparnis an teurem Serum, lösen aber das Problem nicht prinzipiell.

Einen ersten systematischen Versuch macht GUNBERG (1976), indem er nach essentiellen Faktoren sucht, die für die in vitro-Entwicklung der Embryonen notwendig sind. Hierzu vergleicht er das Wachstum der Embryonen in Kultur bei Einsatz von Rattenserum, dialysiertem Rattenserum und Tyrode Puffer als Medien der whole embryo culture.

In mit Glukose ergänztem dialysiertem Rattenserum und reinem Rattenserum erzielt GUNBERG (1976) vergleichbar gute Kulturerfolge; in Tyrode Puffer mit Glukosezusatz und dialysiertem Rattenserum ohne Glukosezusatz ist nur ein mangelhaftes bis gar kein Wachstum der Rattenembryonen zu beobachten.

Aufgrund dieser Ergebnisse postuliert GUNBERG (1976) essentielle Wachstumsfaktoren in Form von makromolekularen Serumbestandteilen und schreibt von den dialysierbaren Serumanteilen allein der Glukose eine entscheidende Funktion bei der in vitro-Entwicklung zu.

Diese Aussagen stehen im Widerspruch zu Ergebnissen von KLEE-TRIESCHMANN and NEUBERT (1981), die über erste Erfolge bei der in vitro-Kultivierung von Mäuseembryonen in einem chemisch definierten Medium ohne Zusatz von Serum oder Wachstumsfaktoren berichten; die Embryonen

wachsen in einem modifizierten Biggers' Medium, das sich bei limb-Kulturen bewährt hat (NEUBERT and BARRACH, 1977; BLANKENBURG et al., 1981). Zur Zeit ist nicht zu entscheiden, welche Mediumbestandteile essenziell für die Kultivierung von Nagerembryonen sind.

Der von KLEE-TRIESCHMANN und NEUBERT (1981) eingeschlagene Weg erscheint aufgrund seiner ersten Ergebnisse sehr erfolgversprechend zu sein.

3.2.4 Serumherstellung

Bedeutung des Zeitpunktes der Zentrifugation des Blutes für die Qualität der Serumbereitung

Bei der Vorschrift über die Gewinnung des Humanserums überrascht die Angabe, daß das Spenderblut sofort vor Eintreten der Gerinnung zu zentrifugieren ist. Normalerweise wird geronnenes Blut zur Serumherstellung verwendet.

STEEL (1972) machte die überraschende Beobachtung, daß der Zeitpunkt der Zentrifugation des Blutes bei der Herstellung des Serums Einfluß auf die Entwicklung der Rattenembryonen in Kultur hat: Werden 8,5 Tage alte Rattenembryonen in einem Serum kultiviert, das aus geronnenem Blut gewonnen worden ist, so bilden sich in beinahe allen Fällen Doppelherzen aus (NEW and DANIEL, 1969). Zu einer solchen Mißbildung kommt es, wenn die Verschmelzung der beiden embryonalen Herzanlagen ausbleibt.

Wird hingegen das Blut sofort nach Gewinnung zentrifugiert, so entwickeln sich die Embryonen normal und bleiben auch in ihrem Wachstum nicht zurück (STEEL and NEW, 1974). Bei der Aufklärung dieses Phänomens hat man intensiv nach Unterschieden zwischen den beiden verschiedenen Seren gesucht.

Einen möglichen Ansatz zur Beantwortung dieser Frage liefern KLEIN et al. (1978) durch Untersuchungen mit Hilfe der Gelelektrophorese. Hierbei zeigte sich, daß sich die beiden Seren durch Fehlen oder Verminderung bestimmter Eiweißbanden unterscheiden.

Läßt man Rattenembryonen in einem Serum wachsen, das durch sofortige Zentrifugation erstellt worden ist, so haben sich nach 48stündiger Kultur die

gleichen Eiweißbanden vermindert, die auch in einem Serum vermindert sind oder fehlen, das aus geronnenem Blut gewonnen worden ist. Der beweisende Versuch, nämlich Kultivierung von Rattenembryonen in einem durch Zentrifugation nach Gerinnung des Blutes gewonnenen Serum unter Zusatz der ansonsten verminderten Eiweißfraktion, steht noch aus.

Obgleich die Beobachtungen von STEEL (1972) überraschend und aus naturwissenschaftlicher Sicht fragwürdig erscheinen, gibt es keine Arbeit auf dem Gebiet der whole embryo culture, in der ein Serum als Medium verwandt wird, das durch Zentrifugation des Blutes nach Gerinnung hergestellt worden ist.

3.2.5. Serumherstellung Bedeutung der Hitzeinaktivierung des Serums

Ein Maximum an Proteinzunahme und Differenzierung sowie ein Abnahme der Häufigkeit von Mißbildungen bei der Kultivierung von Rattenembryonen erhält man, wenn man das Serum vor Gebrauch 30 Minuten lang auf 56 Grad Celsius erhitzt (STEEL and NEW, 1974; NEW et al., 1976). Die Erhitzung von Serum ist eine Standardmethode zur Inaktivierung des Komplementsystems. Ungeklärt ist, welche anderen Proteine bei 56 Grad Celsius auch noch denaturiert werden.

Mit der Inaktivierung des Komplementsystems sollen komplementabhängige Immunreaktionen verhindert werden. NEW (1978) stellt die Frage, wieso in vitro solche Immunreaktionen aktiv verhindert werden müssen, während in vivo der Embryo ebenfalls dem Immunsystem der Mutter ausgesetzt ist. Eine mögliche Antwort auf diese Frage liefern die Untersuchungen von JENSH et al. (1977), die nachweisen konnten, daß die Reichertsche Membran gegen den Dottersack gerichtete Antikörper absorbieren kann. Der Reichertschen Membran und den auf ihr haftenden Trophoblastzellen könnte demnach eine gewisse Sperrfunktion zukommen, indem sie Immunreaktionen zwischen Embryo und Mutter verhindern (NEW, 1978).

Da die Reichertsche Membran bei der Präparation der Rattenembryonen aufgerissen wird, kann sie bei Embryonen in Kultur diese Schutzfunktion nicht übernehmen. Um die Embryonen nicht schutzlos den Immunangriffen des Serums auszusetzen, erscheint es sinnvoll, vor Kulturbeginn das Komplementsystem des verwandten Serums zu zerstören.

3.2.6. Vorteile des Tyrode Phosphat-Puffers

Der übliche Tyrode-Puffer, wie ihn auch COCKROFT (1977) bei der whole embryo culture verwendet, arbeitet mit dem Kohlensäure/Bicarbonat-System.

Im Körper schafft dieses System optimale Voraussetzungen für eine kontinuierliche Feineinstellung des physiologischen PH-Wertes. Da der CO_2 -Partialdruck im Blut über die Atmung reguliert wird, hat der Körper die Möglichkeit, sehr schnell und effektiv auf PH-Änderungen zu reagieren.

Für Kultur- und Präparationszwecke bringt der CO_2 /Bicarbonat-Puffer keine Vorteile. Bei der Präparation der Embryonen in der offenen Petrischale benötigt man einen Puffer, der unabhängig vom sinkenden pCO_2 den PH konstant hält.

Will man Substanzen, z.B. Arzneimittel, dem Kulturmedium zusetzen, so wird man sie zuerst im Puffer zu lösen versuchen. Auch hier kann man keinen Puffer gebrauchen, dessen PH vom CO_2 -Partialdruck abhängt.

Für unsere Bedürfnisse bot sich der ebenfalls physiologische Puffer aus primärem und sekundärem Phosphat an. Mit einem PK-Wert von 6,8 bietet er gute Voraussetzungen, den PH-Wert des Kultur- und Präparationsmediums bei 7,2 konstant zu halten.

3.3. Begasung

Wahl einer optimalen O_2 -Konzentration im Gasgemisch für die whole embryo culture

NEW et al.(1976) vermuten in der die Eihüllen umgebenden Decidua der Ratte einen O_2 -Partialdruck von 40-90mm Hg. Diese Spekulation beruht auf Arbeiten von YOCHIM and MITCHELL (1968) und COMLINE and SILVER (1975), die den Sauerstoffpartialdruck in der arteria uterina und teilweise auch im Uteruslumen bei Ratte, Schaf und Kuh gemessen haben.

Begast man die in vitro-Kulturen mit einem Gasgemisch, das 30% O_2 enthält, so beträgt der Sauerstoffpartialdruck annähernd 230mm Hg.

Auf den ersten Blick überrascht der hohe Wert. Ganz anders schauen die Verhältnisse aus, wenn man nicht die Partialdrucke, sondern die wirklich im Medium oder Blut vorliegenden Sauerstoffmengen betrachtet. Geht man davon aus, daß zwischen Gas und Flüssigkeit ein thermodynamisches Gleichgewicht herrscht, so errechnet sich für einen Sauerstoffpartialdruck von 230mm Hg eine Konzentration von 0,0073ml gelösten Sauerstoffs in 1ml Medium.

Dieser Wert ergibt sich, wenn man den Gasdruck in die Formel nach Henry-Dalton einsetzt :

$$\text{Konzentration des gelösten Gases (ml/ml)} = \frac{\text{Löslichkeitskoeffizient} \times \text{Partialdruck (mmHg)}}{760}$$

Der Löslichkeitskoeffizient für Wasser oder Blut von O₂ beträgt 0,024 (ml Gas/ml Lösungsmittel • atm) (THEWS, 1977).

Im arteriellen Blut hingegen reichen schon 40mm Hg Sauerstoffpartialdruck aus, um mit Hilfe des Hämoglobins 0,15ml O₂ in 1ml Blut zu binden (THEWS, 1977).

Für den O₂/CO₂-Gasaustausch des Rattenembryos in der Zeit von Tag 10 bis Tag 11,3 ist der Dottersack verantwortlich. Im Gegensatz zu in vivo-Verhältnissen hat unter in vitro-Bedingungen innerhalb des Eizylinders der an Hämoglobin gebundene Sauerstoffanteil wenig Bedeutung für die Sauerstoffversorgung des Embryos.

ROBKIN and COCKROFT (1978) konnten feststellen, daß in erster Linie physikalisch gelöster Sauerstoff mittels Diffusion, unterstützt durch die Dottersackzirkulation, den Embryo erreicht.

Erhöht man den Sauerstoffpartialdruck im Gasgemisch für die Kultur, so bringt man mehr Sauerstoff in Lösung. Aufgrund dieser Überlegungen erscheint ein Anteil von 30% Sauerstoff im Gasgemisch ein berechtigter Versuch zu sein, die O₂-Versorgung der in vitro wachsenden Embryonen zu verbessern.

Trotzdem wäre es falsch zu glauben, daß in jedem Stadium der in vitro-Embryonalentwicklung ein maximales O_2 -Angebot eine optimale Entwicklung garantiert.

MORRIS and NEW (1979) konnten in Anlehnung an Arbeiten von NEW et al.(1970a) bei der Kultivierung von Rattenembryonen am Tag 9,5 zeigen, daß eine zu hohe O_2 -Konzentration die Embryonalentwicklung in vitro hemmt.

Während man bei einem Anteil von 5%-10% Sauerstoff im Gasgemisch eine mit in vivo-Verhältnissen vergleichbare Entwicklung erhält, führt eine 20%-40% Sauerstoffkonzentration bei den Embryonen zu einer Verzögerung des Schlusses der kranialen Neuralfalten zum Neuralrohr. Über diesen makroskopisch sichtbaren Effekt hinaus konnten NEW and MORRIS (1979) zeigen, daß auch der Prozeß des physiologischen Zelltodes im Bereich des Neuroepithels durch eine zu hohe O_2 -Konzentration behindert wird.

Beginnt man erst am Tag 10,3 mit der Kultivierung der Embryonen - wie in der vorliegenden Arbeit -, so sind bei einer O_2 -Konzentration von 30% keine solchen Effekte zu beobachten, obgleich auch bei Embryonen dieses Gestationsalters das Neuralrohr noch nicht völlig geschlossen ist.

Spätestens am Tag 11,3 übernimmt die allantoide Placenta unter in vivo-Bedingungen einen entscheidenden Anteil des embryonalen Gasaustausches. Bei der Kultivierung von Rattenembryonen bildet sich keine funktionierende Placenta aus, so daß die in vitro-Embryonen weiterhin auf den Gasaustausch durch den Dottersack angewiesen sind.

Die Erhöhung des O_2 -Anteils auf 95% am Tag 11,3 ist der Versuch, durch ein erhöhtes O_2 -Angebot den Nachteil der fehlenden Placentafunktion auszugleichen. Wie aus den Kulturergebnissen (vgl. S.45-47) zu sehen ist, ist dieser Versuch nur in Teilen erfolgreich.

Für die Anzüchtung von 12,5 Tage alten Embryonen reicht ein 95%iges Sauerstoffangebot nicht aus. Hier muß entweder der Sauerstoff unter Überdruck in die Kultur geleitet werden (NEW and COPOLLA, 1970), oder der Dottersack geöffnet werden, um die Diffusion des Sauerstoffs zum Embryo zu erleichtern (COCKROFT, 1973).

3.4. Präparationstechnik

Bei der Präparation der Rattenembryonen für die whole embryo culture überrascht die Vorschrift, die Reichertsche Membran öffnen zu müssen. Während die übrigen Eihüllen möglichst nicht verletzt werden sollen (COCKROFT, 1977), ist nur mit eingerissener Reichertscher Membran eine gute in vitro-Entwicklung der Embryonen zu erhalten.

Die Präparationsvorschrift, die Reichertsche Membran einreißen zu müssen, geht auf früheste Erfahrungen von JOLLY und LIEURE (1938) und NICHOLAS und RUDNICK (1938) zurück.

Reißt man die Membran nicht ein, so behindert sie Dottersack und Embryo in ihrer Entwicklung (NEW and STEIN, 1964). Aus welchen Gründen die Reichertsche Membran unter Kulturbedingungen im Gegensatz zu den anderen Eihüllen kein Wachstum zeigt, ist völlig ungeklärt.

Die Warnung, bei der Präparation und insbesondere beim Einreißen der Reichertschen Membran keine weiteren Strukturen zu verletzen, ist sicher prinzipiell richtig.

Überraschend war die Erfahrung, daß sich auch Eizylinder mit verletzten und kollabierten Eihüllen beim Versuch der Kultivierung völlig normal entwickelten.

Von gleichen Erfahrungen berichtet DEUCHAR (1969, 1975), der für seine mikrochirurgischen Eingriffe an Rattenembryonen, Dottersack und Amnion punktieren mußte. DEUCHAR stellte fest, daß die verletzten Eihüllen innerhalb kürzester Zeit heilten und keinen Einfluß auf in vitro-Wachstum und -Entwicklung der Embryonen hatten.

3.5. Abschließende Anmerkung zu den Methoden der whole embryo culture

Die hier vorgestellte Methode zur Kultivierung von Rattenembryonen ist das Ergebnis erster Kulturversuche. Jede Arbeitsgruppe, die mit dieser Kultur arbeitet, formuliert aufgrund eigener Erfahrungen ihre "optimalen" Kulturbedingungen.

Da wir nicht wissen, welche unserer Kulturbedingungen essentiell für ein in vitro-Wachstum sind und welche nicht, achten wir peinlichst auf die Einhaltung aller Arbeitsvorschriften.

Hierdurch entsteht leicht der Eindruck, die whole embryo culture habe mehr mit einer kultischen Handlung als mit Wissenschaft zu tun.

Die Auswahl und die Zusammensetzung des "wahren" Mediums sind ein Beispiel hierfür. Es wird eine schier unerschöpfliche "Mediendiskussion" geführt, die sich allein am Kulturerfolg orientiert. Die Fragen nach dem "wie" und "warum" werden so gut wie nicht angesprochen.

Trotzdem wäre es falsch, alle Kulturbedingungen als bewährte Empirie oder als letztlich unerklärlich abzutun. Auch bei der Kultivierung von Rattenembryonen müssen physiologische Bedingungen eingehalten werden. Abweichungen hiervon, wie z.B. erhöhter Sauerstoffpartialdruck des Begasungsgemisches, können diskutiert und begründet werden.

Es überrascht nicht, daß drastische und offensichtlich unphysiologische Änderungen der Temperatur (COCKROFT and NEW, 1978) oder der Glukosekonzentration im Medium (COCKROFT and COPOLLA, 1977) eine normale Entwicklung der Embryonen in Kultur verhindern.

Um eine Störung der in vitro-Entwicklung der Embryonen in einem solch empfindlichen System, wie der whole embryo culture, zu erreichen, sind der Phantasie keine Grenzen gesetzt.

Allerdings auch subtilere Variationen der Kulturbedingungen, wie zum Beispiel scheinbar belanglose Verfahrensänderungen bei der Serumgewinnung (STEELE, 1972), können eine Normalentwicklung der Embryonen verhindern.

Abschließend darf nicht unerwähnt bleiben, daß gelegentlich die whole embryo culture keine oder keine befriedigenden Ergebnisse liefert, ohne daß man sich einer Änderung der Kulturbedingungen bewußt ist (vgl. S. 57).

4. ERGEBNISSE und DISKUSSION

4.1. Vorbemerkung

Für die Beurteilung und Einschätzung einer whole embryo culture sind Angaben über das Kulturergebnis und den Kulturerfolg erforderlich.

Das Kulturergebnis gibt Auskunft über Differenzierung und Wachstum der Embryonen in Kultur.

Um die Differenzierung der Embryonen beurteilen zu können, muß man die Organe kennen, die während der Kulturdauer eine Entwicklung durchmachen. Hierzu ist eine genaue makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Embryonen erforderlich.

Die Somitenzahl liefert einen Anhalt für den Entwicklungsgrad der Embryonen.

Ein gutes Maß für das Wachstum der Embryonen sind der DNA- und Proteingehalt.

Der Kulturerfolg informiert über den Anteil an in die Kultur gegebenen Embryonen, die das beschriebene Kulturergebnis erreichen.

BROWN et al.(1980) bieten für die Beurteilung der in vitro-Entwicklung der Ratte in der whole embryo culture ein sogenanntes "scoring system" an. Für die zahlenmäßige Erfassung des Differenzierungsgrades haben sie ein Punktsystem aufgebaut, nach dem das Maß der Entwicklung einzelner embryonaler Organe - wie z.B. Kiemenbögen, Herz- oder Extremitätenanlagen - eingeschätzt werden kann. BROWN et al.(1980) können eine lineare Beziehung zwischen Gestationsalter und Differenzierungsgrad sowie zwischen Gestationsalter und Somitenzahl feststellen und formulieren. Mit Hilfe von Gleichungen läßt sich mathematisch exakt bestimmen, welcher Differenzierungsgrad (in Punkten ausgedrückt) welcher Somitenzahl und welchem Gestationsalter entspricht. Entwicklungsrückstände können auf diese Weise in Form einer Zahl quantitativ beschrieben werden. Einzelne Kulturergeb-

nisse der whole embryo culture können ohne in vivo-Vergleiche beurteilt werden.

Fragwürdig ist es sicherlich, aufgrund solcher Rechenexempel zu behaupten, die Embryonen in Kultur hätten sich normal entwickelt.

Weder makroskopisch sichtbare Mißbildungen noch mit Hilfe der Mikroskopie zu erkennende Gewebsschäden - wie z.B. Nekrosen - werden in dem "scoring system" berücksichtigt.

Der Feststellung, die Embryonen in Kultur hätten sich - mit in vivo-Embryonen vergleichbar - normal entwickelt, muß eine genaue makroskopische und mikroskopische Untersuchung vorausgehen.

Das gleiche gilt für die Einschätzung embryotoxischer Effekte. Beschränkt man sich hier auf eine grobe makroskopische Überprüfung der Embryonen anhand einer Checkliste - wie bei dem "scoring system" von BROWN et al.(1980) - so wird viel Information verloren gehen.

Ein gutes Beispiel hierfür ist die Arbeit von SIM et al.(1983), in der der Einfluß des Alkaloids Jervin auf die in vitro-Entwicklung von Rattenembryonen untersucht wird.

Betrachtet man allein den nach BROWN et al.(1980) errechneten "morphological score", so unterscheiden sich Kontrollen (41,6 Punkte) und mit höchster Dosis behandelte Embryonen (38,4 Punkte) um ganze 3,2 Punkte in ihrer Entwicklung. Erst die genaue makroskopische und mikroskopische Untersuchung der Embryonen zeigt, daß alle mit höchster Jervindosis behandelten Embryonen schwerste Schäden der Augenanlagen und des Hirnbläschens davongetragen haben.

Hat man die Normalentwicklung der in vitro gewachsenen Embryonen durch histologische Untersuchungen bestätigt, so können zur Aufdeckung embryotoxischer Effekte ebenfalls mikroskopische Untersuchungen hinzugezogen werden. Ein Vorteil der Mikroskopie liegt darin, daß Schädigungen des in vitro gewachsenen Embryos erkannt werden können, die makroskopisch noch nicht in Erscheinung treten.

Dieser Vorteil bekommt besonderes Gewicht, wenn man die kurze Kulturdauer von 24 Stunden oder 48 Stunden in die Betrachtung mit einbezieht. Im Gegensatz zu in vivo-Versuchen, gibt man dem Embryo in Kultur kaum ausreichend Zeit, auf eine gesetzte Schädigung mit einer makroskopisch sichtbaren Fehlentwicklung oder gar Mißbildung zu reagieren.

Vorsicht ist bei der endgültigen Beurteilung der histologisch erhobenen Befunde geboten: In vielen Fällen kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die mikroskopisch sichtbaren Schädigungen einer Organanlage letztlich zu einer Mißbildung führen würden, oder ob es durch Reparaturmechanismen zu einer restitutio ad integrum kommen würde.

4.2. Makroskopische und mikroskopische Beschreibung der Entwicklung der Rattenembryonen von Tag 10 (5-6 Somiten) bis Tag 12,5 (33-37 Somiten)

Die Beschreibung der Entwicklung der Embryonen ist in Stadien gegliedert; jedem Stadium wird ein bestimmtes Gestationsalter zugeschrieben.

Diese Zuordnung ist insofern zulässig, als sie grobe Anhaltspunkte liefert; sie ist willkürlich, da durch die normale Streuung kein Entwicklungsstadium eindeutig einem bestimmten Gestationsalter zuzuordnen ist.

Die Gliederung der Entwicklung der Rattenembryonen während der Organogenese in Stadien entspringt dem Bedürfnis nach Übersichtlichkeit und Ordnung.

Leider muß man allzu oft feststellen, daß sich die Entwicklung der Embryonen sehr wenig an die vorgegebenen Stadien hält. So findet man in vivo- und auch in vitro-Embryonen, die aufgrund einiger Merkmale in ein bestimmtes Stadium gehören, die aber gleichzeitig bei Berücksichtigung eines anderen morphologischen Merkmals in ein höheres oder niedrigeres Stadium eingeordnet werden müßten.

So kann man am Tag 12,3 (Stadium G) in vivo-Embryonen antreffen, deren Urogenitalleiste altersentsprechend gut ausgebildet ist; bei den gleichen

Embryonen ist aber die Abschnürung des Linsengrübchens zum Linsenbläschen, ein Entwicklungsabschnitt, der in der Regel in das Stadium F (Tag 12) fällt, noch nicht erfolgt.

Die Abgrenzung der Stadien bei der Beschreibung der Entwicklung der Rattenembryonen erfolgt nach rein morphologischen Gesichtspunkten.

In Anlehnung an WITSCHI (1962) und CHRISTIE (1964) ist in der vorliegenden Arbeit eine eigene Einteilung vorgenommen worden. Die Entwicklung vom 5-6-Somitenstadium bis zum 33-37-Somitenstadium ist in 7 Stadien (A-G) eingeteilt. Nach WITSCHI (1962) entspricht diese Entwicklungsphase den Stadien 15-20, CHRISTI (1964) unterteilt die gleiche Entwicklungsperiode in die Stadien 17-22 B.

Stadium A

5-6 Somiten

Tag 10

Der Rattenembryo hat sich noch nicht gedreht. Innerhalb des Eizylinders sind das Ektoderm nach innen und das Entoderm nach außen gerichtet.

Der Embryo ist U-förmig gestaltet; der ventrale Anteil des Embryos liegt dem Eizylinder konvex an, der dorsale Anteil des Embryos ist konkav gebogen und zeigt in den Eizylinder hinein.

Nach Aufrichtung der lateralen Ränder der Neuralplatte zu den Neuralfalten bildet sich die Neuralrinne aus. Unterhalb der Herzanlage hat sich die Neuralrinne zum Neuralrohr geschlossen, weiter kranial und kaudal findet man noch die offene Neuralrinne.

Der Schluß des Entodermrohres verhält sich hierzu gegensätzlich: Im Bereich des Kopfes und des Herzens ist das Entodermrohr noch offen, kaudal davon ist das Entoderm zu einem Rohr verschmolzen.

In diesem Stadium ist an Organen allein das Herz deutlich zu erkennen. Der ursprünglich gerade verlaufende Herzschlauch beginnt eine C-förmige Schleife zu bilden.

Die Anlagen des 1. Kiemenbogens (Unterkieferwülste) beginnen sich auszubilden.

Die an der Hinterwand des Dottersackes gelegene Allantois nimmt deutlich an Größe zu, verschmilzt aber noch nicht mit dem Ektoplacentarkonus.

Stadium B

7-9 Somiten

Tag 10,3

Der Rattenembryo beginnt sich zu drehen : Der Embryo beginnt die Drehung mit dem Kopf und der angrenzenden Halsregion, der Rest wird wahrscheinlich passiv mitgedreht (DEUCHAR 1971).

SNELL (1941) beschreibt bei der Untersuchung der Entwicklung der Maus eine Linksdrehung um die eigene Achse des Embryos, DEUCHAR (1971) kann bei der Ratte eine Rechtsdrehung nachweisen.

Vom Bereich der Herzanlage (4. Somit) ausgehend bildet sich das Neuralrohr nach kranial bis zum ersten Somiten und nach kaudal bis zum achten Somiten.

Die Anlagen des ersten Kiemenbogens wachsen weiter, die Anlagen des zweiten Kiemenbogens treten in Erscheinung.

Die Allantois verschmilzt mit dem Ektoplacentarkonus.

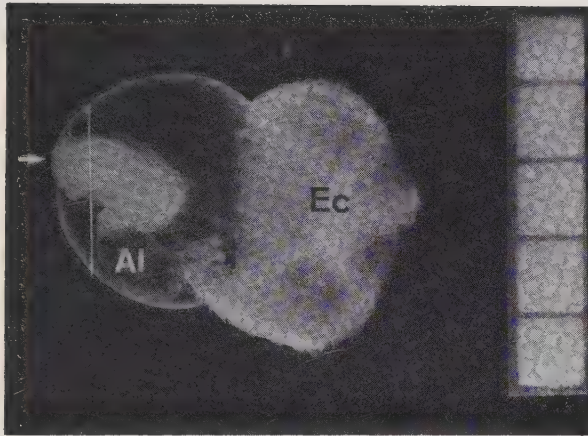


Abbildung 4.2.1.

Eizylinder eines Rattenembryos am Tag 10 (Stadium A; 5-6 Somiten). Der Embryo hat sich noch nicht gedreht.

Das Entoderm (→) ist nach außen gerichtet. Die Allantois (Al) hat den Ektoplacentarkonus (Ec) noch nicht erreicht.

Die den Embryo schneidende Linie kennzeichnet die Schnittebene von Abbildung 4.2.2.

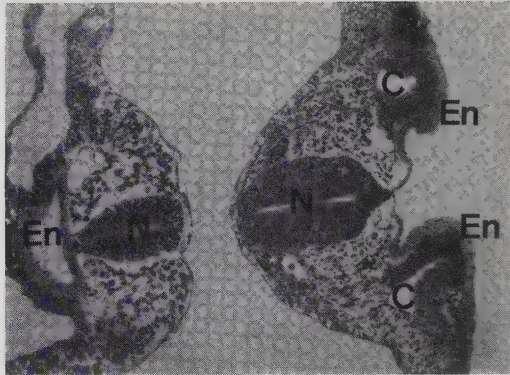


Abbildung 4.2.2.

Querschnitt durch einen Embryo vom Tag 10 (Stadium A mit 5-6 Somiten). Der Embryo hat sich noch nicht gedreht.

Das Neuralrohr (N) ist nach innen gerichtet, das Entoderm (En) zeigt nach außen.

Im Bereich der Herzanlage (H) ist das Entoderm noch offen, weiter kaudal ist es bereits zu einem Rohr verschmolzen.

C = intraembryonales Coelom

Stadium C

10-13 Somiten

Tag 10,5

Die Drehung des Embryos schreitet weiter fort, findet aber erst im nächsten Stadium ihren Abschluß.

Der Kopf des Rattenembryos hat sich um 180 Grad gedreht, die Herzanlage befindet sich in der konvexen Krümmung, die Drehung des Schwanzteiles steht noch aus.

Die Neuralrinne hat sich in ihrer ganzen Länge zum Neuralrohr geschlossen; allein an seinem kranialen und kaudalen Ende steht das Neuralrohr über den neuroporus anterior und posterior mit der Amnionhöhle in Verbindung.

Die Anlage des Oberkiefers ist als paariger Wulst zu erkennen, die schon früher angelegten Unterkieferwülste entwickeln sich weiter, haben sich aber in diesem Stadium noch nicht in der Mitte getroffen.

In der Höhe des Rautenhirns - also zwischen Scheitel- und Nackenbeuge - dorsal von der ersten Kiemenfurche erkennt man beidseits zwar zarte Verdickungen des Oberflächenektoderms. Bei diesen Ektodermverdickungen handelt es sich um die beiden Ohrplakoden, die noch in diesem Stadium beginnen, sich zu senken und die Ohrgrübchen zu bilden.

Durch schmale Einsenkungen des Prosencephalons formen sich die Augenfurchen. Aus den Augenfurchen - den ersten Augenanlagen des Embryos - entwickeln sich durch weitere Ausbuchtung die Augenbläschen, die schließlich Kontakt mit dem Ektoderm bekommen.

Später führt der innige Kontakt zwischen Augenbläschen und Ektoderm zu einer zarten Ektodermverdickung, der Linsenplakode.

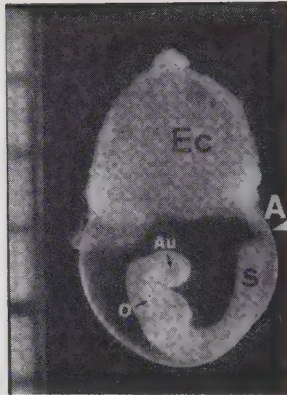


Abbildung 4.2.3.

Eizylinder eines Rattenembryos am Tag 10,5 (Stadium C; 10-13 Somiten).

Kopf und Herzanlage haben sich bereits gedreht; die Drehung des Schwanzes (S) steht noch aus.

Ohrplakode (→O) und Augenanlage (→Au) sind gerade erkennbar. Die Allantois (→A1) ist mit dem Ektoplacentarkonus (Ec) verschmolzen.

Stadium D

14-22 Somiten

Tag 11

Spätestens mit 17 Somiten hat sich der Embryo völlig gedreht. Der ventrale Anteil des Embryos ist konkav gekrümmt und zur Amnionhöhle hin gerichtet, der dorsale Anteil des Embryos liegt konvex den Eihüllen an.

Im 18-20-Somitenstadium verschließt sich die kraniale Öffnung des Neuralrohres, der neuroporus anterior. Der neuroporus posterior schließt sich erst mit Beginn des nächsten Stadiums bei 23-24 Somiten.

Auch das Entoderm schließt sich in seiner ganzen Länge; zwischen Entoderm und Dottersack besteht somit keine Verbindung mehr.

Die Herzentwicklung macht große Fortschritte: War bisher der Herzschauch nur leicht in Form eines C gebogen, so nimmt er jetzt die Gestalt einer Schleife in Form eines stehenden U an.

Man kann einen auf- und absteigenden Schenkel der Herzschleife unterscheiden, wobei zwischen den beiden Schenkeln der sulcus bulboventricularis liegt.

Den aufsteigenden Teil bildet der bulbus cordis, zum absteigenden Schenkel der Schleife gehört der embryonale Ventrikel.

Nimmt man den sich in diesem Stadium herausbildenden Vorhof mit in die Skizze auf, so erhält man eine Herzanlage in der Gestalt eines liegenden S.

Die beiden Anlagen des Mandibularbogens (1. Kiemenbogen) erreichen die Mittellinie, verschmelzen aber noch nicht miteinander.

Der dritte Kiemenbogen beginnt sich auszubilden.

Das Ohrgrübchen senkt sich weiter ab, schließt sich aber noch nicht zum Ohrbläschen.

Am auffälligsten für dieses Stadium ist die Ausbildung der vorderen Extremitätenknospe. Anfangs zeigen sich zwei kleine Buckel in Höhe des 6.-9. Somiten; erreicht der Embryo das 20-Somitenstadium, so liegt das kaudale Ende der oberen Extremitätenknospe gegenüber vom 10.-11. Somiten.

Die Extremitätenknospen stammen vom parietalen Mesoderm ab und werden vom Ektoderm überdeckt.

Eine Verdickung des Ektoderms zur Randleiste ist erst im übernächsten Stadium (29-32 Somiten) zu erkennen.

Am Boden des kranialen Anteils des Vorderdarms, des sogenannten Schlunddarms, bildet sich als zarte Epithelknospe die Schilddrüsenanlage, die im nächsten Stadium in das benachbarte Mesoderm eindringt und nach kaudal wandert.

In Höhe des kranialen Ansatzes der vorderen limb-Anlage entwickelt sich die Leber aus einer Ausbuchtung des distalen Endes des Vorderdarms.

In den beiden folgenden Stadien wachsen die epithelialen Leberstränge in das horizontal gelegene septum transversum ein.

Stadium E

23-27 Somiten

Tag 11,3

Mit Erreichen des 23-24-Somitenstadiums verschließt sich der neuroporus posterior, so daß es keine offene Verbindung zwischen Embryo und Amnionhöhle mehr gibt.

Der noch im letzten Stadium in Form eines liegenden S beschriebene Herzschlauch entwickelt sich weiter : Der truncus arteriosus, aus dem sich später der aufsteigende Ast der Aorta und der Stamm der arteria pulmonalis bilden, drückt das Dach des gemeinsamen Vorhofs ein, so daß man eine Teilung in rechten und linken Vorhof ahnen kann.

Das Gleiche gilt für die Ventrikel : Im Bereich des sulcus bulboventricularis kommt es durch Anlage des muskulösen septum interventriculare zu einer ersten Andeutung einer Teilung des gemeinsamen Ventrikels in rechte und linke Kammer.

Das 23-24-Somitenstadium ist der früheste Zeitpunkt, zu dem man eine Gliederung des Herzens in zwei Vorhöfe und zwei Kammern erkennen kann.

Im jetzigen Stadium beginnen sich auch die Gesichtsstrukturen deutlicher auszuprägen. Zu den schon oben beschriebenen Oberkieferwülsten und den noch nicht miteinander verschmolzenen Anlagen des Mandibularbogens erscheinen auf dem Stirnfortsatz zwei Riechplakoden, die ebenfalls wie Linsen- und Ohrplakode ekotdermalen Ursprungs sind.

Diese Riechplakoden werden jeweils von einem neu sich bildenden lateralen und medialen Nasenwulst umgeben.

In der weiteren Entwicklung strebt der Oberkieferwulst auf den lateralen Nasenwulst zu.

Die hintere Extremitätenknospe erscheint am Ende dieses Stadiums in Höhe des 24.-25. Somiten.

Beinahe gleichzeitig mit dem Schluß des neuroporus posterior schließt sich wieder das Ektoderm über dem Ohrgrübchen und bildet das Ohrbläschen. Das Ohrbläschen bleibt aber nicht in dieser Form bestehen, sondern noch innerhalb dieses Stadiums treten der saccus und ductus endolymphaticus als ein nach dorso-medial ziehendes Divertikel in Erscheinung.

Der Kontakt zwischen Ektoderm und Augenbläschen induziert die Bildung der Linsenplakode.

Parallel zum Schluß des Ohrgrübchens beginnen die Linsenplakode und das der Linsenplakode anliegende Augenbläschen sich einzusenken.

Während sich im Laufe der nächsten Stadien aus dem Augenbläschen der Augenbecher formt, senkt sich die Linsenplakode zum Linsengrübchen ein.

Die Schilddrüsenanlage, die im letzten Stadium noch eine zarte Epithelknospe war, wandert jetzt vor dem Schlunddarm als zweizipfeliges Diverticulum über eine Entfernung von 4 Somiten nach kaudal; die Stelle am Schlunddarm, an der die Schilddrüse ihre Wanderung nach kaudal begonnen hat, ist auch noch später als foramen caecum sichtbar.

Typisch für das Stadium zwischen 23 und 27 Somiten ist das erste Auftreten der Rathke'schen Tasche.

Bei der Rathke'schen Tasche handelt es sich um eine ektodermale Ausstülpung im Bereich des Stomodeums oberhalb der Rachenmembran.

Stadium F

28-32 Somiten

Tag 12

Der Oberkieferwulst hat den lateralen Nasenwulst erreicht, beide Gewebsleisten bleiben aber noch durch eine deutliche Furche (nicht Spalte), die Tränennasenfurche, voneinander getrennt.

Bei ungefähr 31 Somiten erlangt der Oberkieferwulst auch den medialen Nasenwulst; zwischen beiden Leisten ist ebenfalls eine Furche erkennbar.

Der mediale und laterale Nasenwulst wachsen aufeinander zu, kommen miteinander in Berührung und beginnen zu verschmelzen. Durch die erhobenen Nasenwülste und die Einstülpung der Riechplakode entsteht die Riechgrube.

Das im vorigen Stadium durch Absenkung der Linsenplakode entstandene Linsengrübchen wird vom Ektoderm abgeschnürt und bildet das Linsenbläschen.

Die Rathke'sche Tasche wächst langsam auf das Infundibulum hin und vertieft sich. Aus der Rathke'schen Tasche entwickelt sich in erster Linie der Hypophysenvorderlappen, während der Hypophysenhinterlappen aus einer Ausstülpung des Zwischenhirns, dem Infundibulum, entsteht.

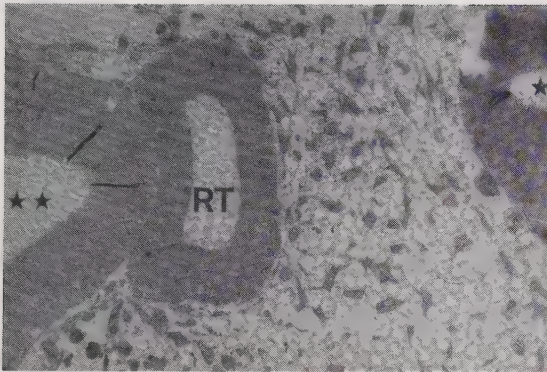


Abbildung 4.2.6.

Querschnitt durch einen Rattenembryo Tag 12 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 41 Stunden Kultur); 29 Somiten, Stadium F.

Der Querschnitt liegt unterhalb der Scheitelbeuge und trifft die Rathke'sche Tasche (RT) zwischen zwei ZNS-Strukturen, von denen die eine dem Diencephalon (**) und die andere dem Rhombencephalon (*) zugerechnet werden kann.

Im Bereich des Prosencephalons noch vor den Linsenbläschen kommt es während dieses Stadiums zur Anlage der Großhirnhemisphären. Sie entsteht durch Ausbuchtung der beiden seitlichen Wände des Prosencephalons. Aus der Vorderwand des Prosencephalons wird die *Lamina terminalis*, die die beiden Großhirnbläschen voneinander trennt.

Die nicht durch Aussackung erweiterten kaudalen Anteile des Prosencephalons werden zum Diencephalon.

Großhirnbläschen und *lamina terminalis* bilden zusammen die Anlage des Telencephalons.

An der vorderen Extremitätenknospe beginnt sich das oberflächliche Ektoderm zu verdicken und die Randleiste zu bilden. Diese ektodermale Randleiste induziert das weitere mesenchymale Wachstum und steuert die Differenzierung der Extremitätenknospe.

Stadium G

33-37 Somiten

Tag 12,5

Die Anlagen des Mandibularbogens beginnen von kaudal nach kranial fortschreitend miteinander zu verschmelzen; am Ende dieses Stadiums ist im Mandibularbereich keine Spalte mehr zu erkennen.

Die Anlagen des 2. Kiemenbogens treten deutlich hervor und erreichen die Mittellinie, ohne miteinander zu verschmelzen.

In der von Oberkieferwulst und lateralem Nasenwulst begrenzten Tränen-nasenfurche zeigt sich ein epithelialer Strang aus ektodermalem Gewebe, der sich in späteren Stadien durch sekundäre Kanalisation zum Tränennasengang umformt.

Wie bei der vorderen Extremität beginnt jetzt auch an der hinteren Extremität das Ektoderm die Randleiste zu bilden.

Medial von der Urniere, die sich schon während des Stadiums F entwickelt hat, kommt die Keimdrüse zum Vorschein.

Beide Anlagen zusammen werden als Urogenitalleiste bezeichnet.

Im Bereich des Laryngotrachealkanals bilden sich die ersten Lungenknospen.

Der Laryngotrachealkanal entwickelt sich aus dem Entodermrohr und ist bereits im Stadium E gut zu erkennen (vgl. Abb. 4.3.11).

4.3. Kulturergebnis

4.3.1. In vivo - in vitro-Vergleich der Entwicklung von Rattenembryonen (Tag 10,3) nach 24 Stunden (Tag 11,3) und 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)

Tag 10,3

Die mittlere Scheitel-Steißlänge der Rattenembryonen am Tag 10,3 liegt zwischen 1,5mm und 1,7mm.

Mit durchschnittlich 9 Somiten am Tag 10,3 (Stadium B) befindet sich der Rattenembryo gerade in der Drehung: Mit dem Kopf voran beschreibt er innerhalb der Amnionhöhle eine Rechtsdrehung um seine eigene Achse herum.

Die Allantois ist bis an den Ektoplacentarkonus herangewachsen und beide Strukturen verschmelzen miteinander.

Mikroskopisch läßt sich ebenfalls die Drehung des Embryos verfolgen: Im Laufe der Drehung verlagert sich innerhalb der Amnionhöhle das Entoderm von außen nach innen und das Ektoderm von innen nach außen.

Bei etwas in ihrer Entwicklung fortgeschrittenen Embryonen ist die unter der Lupe sichtbare Ohranlage als eine zarte Verdickung des Oberflächenektoderms zu erkennen.

Nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3)

Deutliche Unterschiede zwischen in vivo- und in vitro-Entwicklung sind bei den Eihüllen und der Placenta festzustellen.

Während sich in vivo eine deutliche Placenta gebildet hat, sitzt auf dem in vitro gewachsenen Eizylinder weiterhin der Ektoplacentarkonus in Form eines kleinen Häubchens. Die Nabelgefäße sind bei den in vitro-Embryonen blutlose, blasse Gebilde, während sie bei den in vivo-Embryonen als pralle, blutgefüllte Gefäße imponieren.

Der Dottersack ist bei den in vivo-Embryonen stark vaskularisiert, während bei den in vitro-Embryonen nur feine, dünne Gefäße durch den Dottersack ziehen.

Trotz der mangelhaften Ausbildung der für die Ernährung verantwortlichen Organe unter in vitro-Bedingungen ist bei den Embryonen dieses Stadiums kein Unterschied zwischen in vitro- und in vivo-Entwicklung festzustellen (Stadium E).

Bei den Embryonen mit einer Scheitel-Steißlänge von 4,1 - 4,6 mm ist am auffälligsten das pulsierende Herz, das in seiner Struktur deutlich zu erkennen ist. Vorhöfe und Ausflußbahn sind voneinander abgrenzbar, man sieht, wie das Blut durch die Dottersackgefäße und den Embryo gepumpt wird.

Die Anlage der vorderen Extremitäten tritt als eine prominente Gewebeknospe im Bereich des 10. Somiten in Erscheinung, die Entwicklung der hinteren Extremitäten ist zu ahnen.

Zwischen Herz und Kopf sind die Anlagen von drei Kiemenbögen zu erkennen, Ohr- und Augenanlage sind nicht zu übersehen.

Die mikroskopische Untersuchung der Embryonen bestätigt den makroskopischen Eindruck.

Zwischen in vivo und in vitro gewachsenen Embryonen ist kein Entwicklungsunterschied festzustellen.

Am Herzen ist eine erste Teilung in rechten und linken Vorhof zu erkennen, in den Kammern bildet sich das Trabekelwerk aus.

Entwicklung von Ohr und Auge schreiten fort : Bei den Embryonen, bei denen sich das Ohrgrübchen zum Ohrbläschen entwickelt hat, ist auch eine Absenkung von Linsenplakode und Augenbläschen festzustellen.

Nach 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)

Am Tag 12,3 sind deutliche Unterschiede zwischen in vivo und in vitro gewachsenen Embryonen festzustellen.

Allein von der Größe her unterscheiden sie sich.

Der Unterschied liegt weniger in der Scheitel-Steißlänge von 5,9-6,3mm als vielmehr darin, daß die in vivo gewachsenen Embryonen viel dicker sind; die in vitro-Embryonen machen dagegen einen "unterernährten" Eindruck.

Die in vitro gewachsenen Embryonen haben durchschnittlich 3-4 Somiten weniger als die in vivo-Embryonen, ansonsten sind makroskopisch keine großen Entwicklungsunterschiede festzustellen.

Die Großhirnhemisphären sind als deutliche Ausbuchtungen des Prosencephalons zu erkennen.

Die Anlagen des ersten Kiemenbogens haben an Größe zugenommen; selbst bei den in vivo-Embryonen ist es die Ausnahme, daß die Anlagen des ersten Kiemenbogens soweit miteinander verschmolzen sind, daß kein Spalt mehr im Mandibularbereich zu erkennen ist.

Die hintere Extremitätenanlage nimmt deutlich an Größe zu.

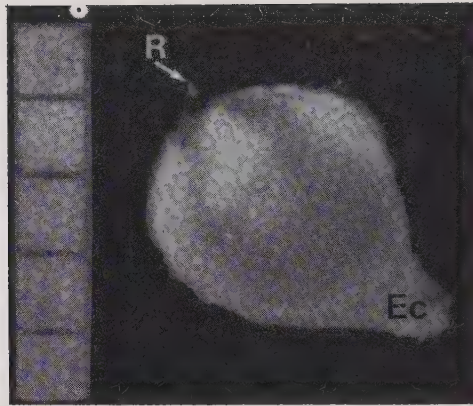


Abbildung 4.3.1.

Eizylinder eines Rattenembryos am Tag 10 (Stadium A; 5-6 Somiten)

Der Eizylinder ist noch bedeckt von Trophoblastzellen, die sich erst nach Einreißen der Reichertschen Membran (→R) in Richtung Ektoplacentarkonus (Ec) zurückziehen.



Abbildung 4.3.2.

Eizylinder eines Rattenembryos am Tag 10,3 (Stadium B mit 7-9 Somiten)

Der Rattenembryo beginnt sich zu drehen: Mit dem Kopf voran (→) beschreibt er innerhalb der Amnionhöhle um die eigene Achse eine Rechtsdrehung.

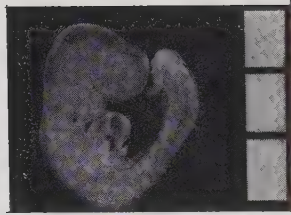


Abbildung 4.3.3.

Rattenembryo Tag 11 in vivo (Stadium D; 17 Somiten)

Der Rattenembryo hat das gleiche Entwicklungsstadium wie der in vitro-Embryo vom Tag 11 in Abbildung 4.3.4.

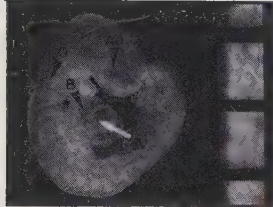


Abbildung 4.3.4.

Rattenembryo Tag 11 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 17 Stunden Kultur (Stadium D; 17 Somiten)

Der Embryo hat sich gedreht.

Ohrenanlage (O) und Augenanlage (Au) sind deutlich zu erkennen. Am Herzen sind ein aufsteigender Schenkel, der bulbus cordis (B), und ein absteigender Schenkel, der embryonale Ventrikel (eV) zu unterscheiden.

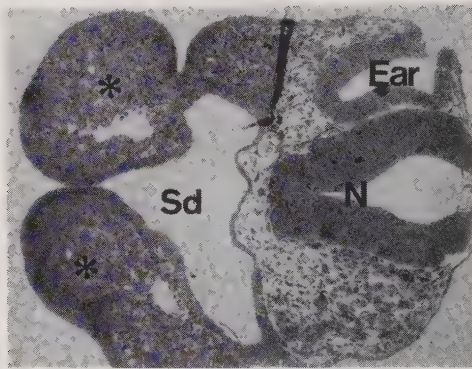


Abbildung 4.3.5.

Querschnitt durch einen Rattenembryo Tag 11 in vivo (17 Somiten; Stadium D)

Der Querschnitt liegt in Höhe der noch nicht miteinander verschmolzenen Anlagen des 1. Kiemenbogens (*).

Das Ohrgrübchen (Ear) hat sich tief angesenkt; erst im nächsten Stadium (23-27 Somiten) schließt sich das Ektoderm wieder über dem Ohrgrübchen und bildet das Ohrbläschen.

(N) = Neuralrohr

(Sd) = Schlunddarm

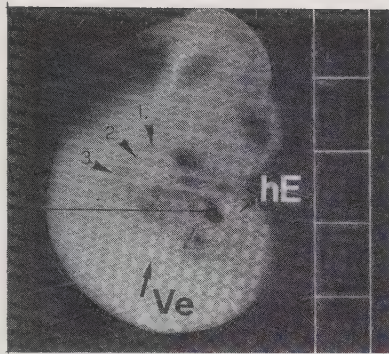


Abbildung 4.3.9.

Rattenembryo Tag 11,3 in vivo
24 Somiten; Stadium E

Der Rattenembryo hat das gleiche Entwicklungsstadium wie der in vitro-Embryo in Abbildung 4.3.10.

Neben der Herzanlage sind die ersten drei Kiemenbögen (→1.→2.→3.; der 3. Kiemenbogen ist auf der Abbildung nur schwer auszumachen) und die vordere (vE) und hintere Extremitätenknospe (hE) zu erkennen.

Die den Embryo schneidende Linie kennzeichnet die Schnittebene von Abbildung 4.3.11.

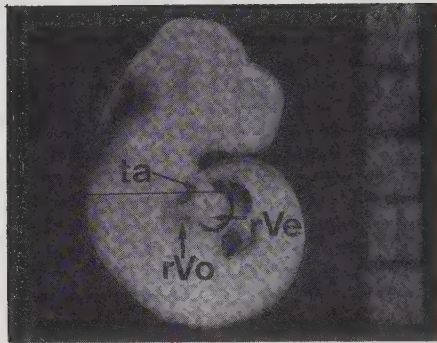


Abbildung 4.3.10.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 24 Stunden Kultur)

24 Somiten; Stadium E

Der rechte Vorhof (rVo), der trabekuläre Anteil des rechten Ventrikels (rVe), der conus cordis und der truncus arteriosus (ta) sind voneinander abgrenzbar.

Die den Embryo schneidende Linie kennzeichnet die Schnittebene von Abbildung 4.3.12.

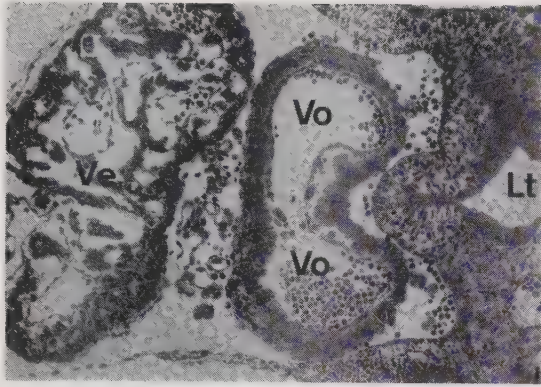


Abbildung 4.3.11.

Querschnitt durch einen Rattenembryo Tag 11,3 in vivo
24 Somiten; Stadium E

Der Querschnitt zeigt Vorhöfe (Vo) und Ventrikel (Ve). Bei den Vorhöfen ist eine Teilung in rechten und linken Vorhof zu erkennen, bei den Ventrikeln bildet sich das Trabekelwerk aus.

(Lt) = Laryngotrachealkanal

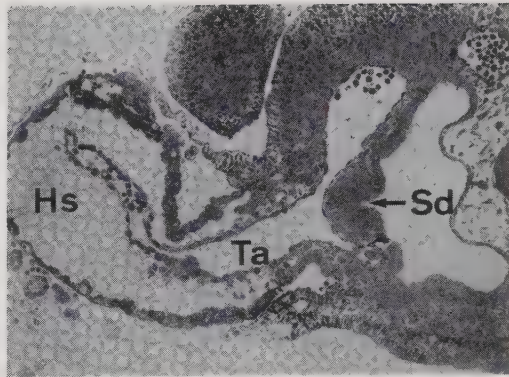


Abbildung 4.3.12.

Querschnitt durch einen Rattenembryo Tag 11,3 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 24 Stunden Kultur)

24 Somiten; Stadium E

Der Querschnitt liegt in Höhe des 2. Kiemenbogens (*).

Das Herz ist an seinem kranialen Ende getroffen, man erkennt den truncus arteriosus (Ta) und die umgebende Herzsulze (Hs).

(Sd) = Schilddrüse

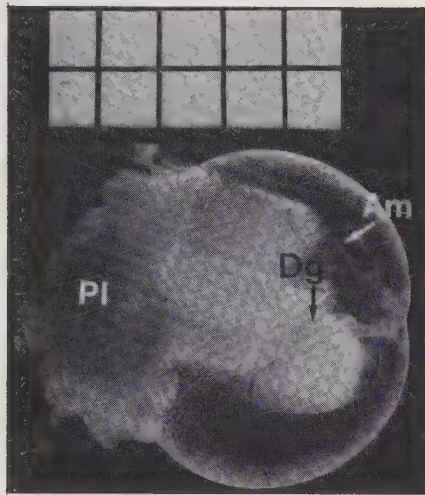


Abbildung 4.3.13.

Rattenembryo Tag 11,3 in vivo

24 Somiten; Stadium E

Der Rattenembryo liegt umgeben vom Amnion (← Am) im Dottersack.

(Dg) = deutlich sichtbare Dottersackgefäße

(Pl) = Placenta

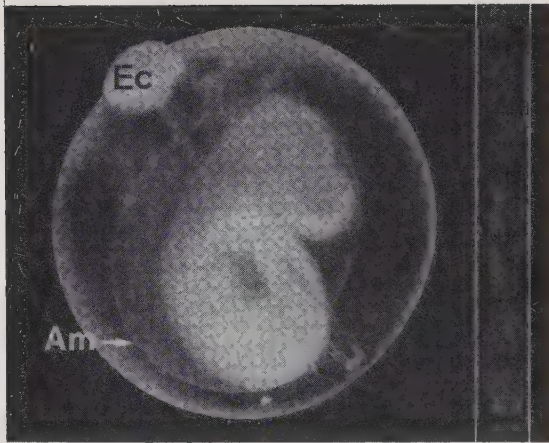


Abbildung 4.3.14.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 24 Stunden Kultur)

24 Somiten; Stadium E

Der Rattenembryo liegt umgeben vom Amnion (←Am) im Dottersack. Die Dottersackgefäße sind nur sehr schwach ausgebildet.

(Ec) = Ekto-placentarkonus

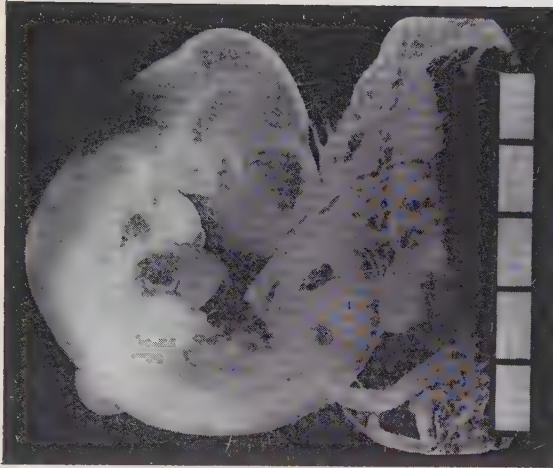


Abbildung 4.3.15.

Rattenembryo Tag 12,3 in vivo
34 Somiten; Stadium G

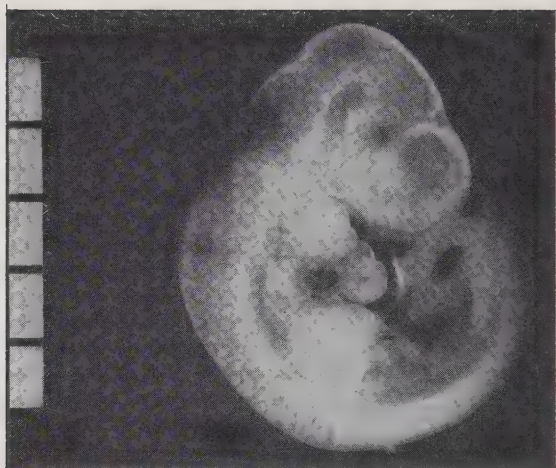


Abbildung 4.3.16.

Rattenembryo Tag 12,3 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 48 Stunden Kultur)

31 Somiten; Stadium F

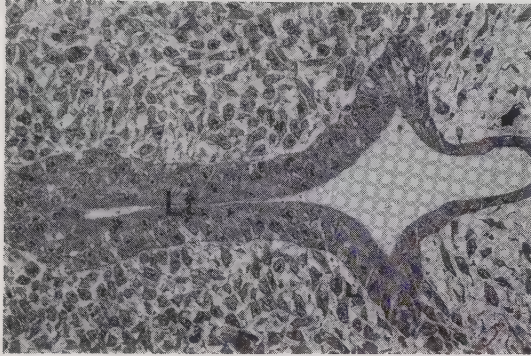


Abbildung 4.3.19.

Schnitt durch den Laryngotrachealkanal eines Rattenembryos Tag 12,3 in vivo

34 Somiten; Stadium G

Im Bereich des Laryngotrachealkanals (Lt) sind noch keine Lungenanlagen zu erkennen.

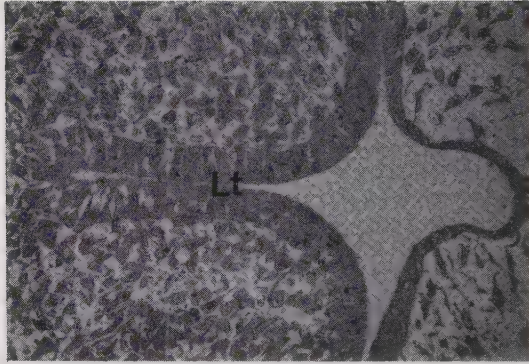


Abbildung 4.3.20.

Schnitt durch den Laryngotrachealkanal eines Rattenembryos Tag 12,3 in vitro (ausgehend von Tag 10,3 nach 48 Stunden Kultur)
31 Somiten; Stadium F

Im Bereich des Laryngotrachealkanals (Lt) sind noch keine Lungenanlagen zu erkennen.

Durch die mikroskopische Untersuchung können auch Entwicklungsrückstände der in vitro-Embryonen erkannt werden.

Neben einer geringeren Differenzierung vieler Organe, wie zum Beispiel der Augen oder Ohren, fehlen bei den in vitro-Embryonen auch Organanlagen, die bei den in vivo-Embryonen gleichen Alters bereits voll angelegt sind.

Ein Beispiel hierfür ist die Urogenitalleiste der in vivo-Embryonen, die bei den in vitro-Embryonen noch fehlt, da sich erst die Urniere auszubilden beginnt.

Die Verdickung des oberflächlichen Ektoderms an der vorderen Extremitätenknospe zur sogenannten Randleiste ist bei den in vitro-Embryonen nur gelegentlich zu beobachten.

Bei den in vivo-Embryonen weist eine Randleiste an den hinteren Extremitätenknospen auf eine für den Tag 12,3 fortgeschrittene Entwicklung hin.

Aufgrund der mikroskopischen Befunde kann man den Entwicklungsrückstand der in vitro-Embryonen auf 6-8 Stunden beziffern; die in vitro-Embryonen erreichen somit einen Entwicklungsstand, der Tag 12 (Stadium F) unter in vivo-Bedingungen entspricht.

4.3.2. In vivo - in vitro-Vergleich des Wachstums von Rattenembryonen (Tag 10,3) nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3) und 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)

Vergleiche Tabelle 4.3.1. und Abbildungen 4.3.21. - 4.3.23.

Protein- und DNA-Gehalt geben Auskunft über das Wachstum der Embryonen; die Somitenzahl dient als Bezugsgröße, mit der die Entwicklung der Embryonen abgeschätzt werden kann.

Eine Trennung der Eizylinder in Hüllen und Embryo bei der Protein- und DNA-Bestimmung war nötig, um ein Wachstum der Eihüllen von einem Wachstum der Embryonen unterscheiden zu können. Insbesondere bei dem in vitro-Wachstum trat gelegentlich der Fall ein (vgl. Tabelle 4.4.1., Nr. 2),

daß die Hüllen sich normal entwickelten, der Embryo aber längst sein Wachstum eingestellt hatte und unter Umständen schon abgestorben war.

Tag 10,3

Bei Rattenembryonen vom Tag 10,3 gelingt eine Trennung in Embryo und Hülle nicht, da die zu unterscheidenden Strukturen für eine exakte Präparation zu klein sind.

Der Proteingehalt der 10,3 Tage alten Eizylinder liegt bei 185µg, der DNA-Gehalt bei 17µg. Die durchschnittliche Somitenzahl beträgt 9 Somiten.

Nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3)

Nach 24 Stunden am Tag 11,3 vervierfacht sich der Proteingehalt der Eizylinder unter in vivo Bedingungen auf knapp 800µg (Embryo : 250µg; Hüllen : 550 µg).

Während beim Proteingehalt kein deutlicher Unterschied zwischen in vivo- und in vitro-Wachstum besteht, fallen beim DNA-Gehalt und auch bei der Somitenzahl signifikante Unterschiede auf.

Die Somitenzahl bei den in vivo-Embryonen liegt am Tag 11,3 bei 25 Somiten, die in vitro-Embryonen erreichen knapp 24 Somiten.

Der DNA-Gehalt steigt innerhalb von 24 Stunden von Tag 10,3 auf Tag 11,3 unter in vivo-Bedingungen um den Faktor 2,6 auf knapp 44µg an (Embryo : 31,5µg; Hüllen : 12,5µg).

Der DNA-Gehalt der in vitro-Embryonen mehrt sich um den Faktor 2,1 und erreicht knapp 36µg (Embryo : 25,5µg; Hüllen : 10,5µg).

Nach 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)

Deutlich werden die in vivo - in vitro-Unterschiede am Tag 12,3.

Liegt der durchschnittliche Proteingehalt der in vivo gewachsenen Embryonen bei 2000 μ g (Embryo : 850 μ g; Hüllen : 1150 μ g), so erreichen die in vitro-Eizylinder nur einen Proteingehalt von annähernd 1450 μ g (Embryo : 650 μ g; Hüllen : 800 μ g).

Der Rückstand der in vitro-Proteinbildung beträgt gegenüber in vivo-Verhältnissen 30 %.

Beim DNA-Gehalt liegen die Verhältnisse ähnlich. Die in vitro-Embryonen bilden weniger DNA als die Embryonen in vivo.

Am Tag 12,3 findet man bei den in vitro gewachsenen Eizylindern 20% weniger DNA als bei den in vivo-Eizylindern. Die in vitro-Embryonen enthalten ca. 45 μ g DNA, die in vivo-Embryonen durchschnittlich 60 μ g DNA pro Embryo.

Während der DNA-Gehalt der Hüllen von in vitro gewachsenen Eizylindern bei knapp 19 μ g DNA liegt, haben die Eihüllen von in vivo-Embryonen durchschnittlich 22 μ g DNA pro Hülle.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Kultur von 10,3 Tage alten Rattenembryonen in den ersten 24 Stunden bis Tag 11,3 hinsichtlich Entwicklung und Wachstum mit in vivo-Verhältnissen vergleichbare Ergebnisse liefert.

Bei der Somitenzahl und dem DNA-Gehalt fällt nach 24stündiger Kultur ein leichter Rückstand der in vitro-Embryonen auf.

Nach 48stündiger Kultur setzt sich diese Tendenz verstärkt bei der Somiten- und Proteinbildung fort. Zeigt die Somitenbildung der in vitro-Embryonen einen Rückstand von 10%, so fällt die Proteinbildung bis zum Tag 12,3 um knapp 30% gegenüber den in vivo-Embryonen ab.

Nach 48 Stunden Kultur am Tag 12,3 unterscheiden sich die in vitro-Embryonen sowohl hinsichtlich ihrer Differenzierung und Entwicklung als auch in ihrer Größe von den entsprechenden in vivo-Embryonen deutlich.

Bemerkenswert ist, daß der Entwicklungsrückstand mit 10% geringer ausfällt als der Wachstumsrückstand mit 20% - 30%.

Durch mikroskopische Untersuchungen war es möglich, den in vitro-Embryonen am Tag 12,3 das Entwicklungsstadium F zuzuordnen, das unter in vivo-Bedingungen Tag 12 entspricht.

Ein Wachstumsrückstand von 20% - 30% läßt den Schluß zu, daß die in vitro-Embryonen in ihrem Wachstum nach 48 Stunden noch nicht Tag 12 (in vivo) erreicht haben.

Man kann vermuten, daß die Differenzierung der in vitro-Embryonen noch fortschreitet, während das Wachstum der Embryonen schon stark eingeschränkt ist.

Tag	Embryo			Hülle		Medium	
	Somiten	Protein (μ g)	DNA (μ g)	Protein (μ g)	DNA (μ g)	Glucose- conc. (mg%)	Lactat- conc. (mg%)
10,3 in vivo	8,9 $\pm$ 1,6 n=45	185 $\pm$ 18,7* n=7	16,8 $\pm$ 2,1* n=7	--	--	364 $\pm$ 4 n=34	10,4 $\pm$ 0,6 n=34
11,3 in vivo	25,2 $\pm$ 0,9 n=30	255 $\pm$ 32 n=9	31,3 $\pm$ 4,9 n=8	549 $\pm$ 45 n=9	12,3 $\pm$ 2,0 n=8	--	--
11,3 in vitro	23,7 $\pm$ 0,7 n=36	243 $\pm$ 28 n=9	25,4 $\pm$ 3,1 ^b n=9	520 $\pm$ 46 n=9	10,5 $\pm$ 2,1 n=9	297 $\pm$ 7 n=17	63,8 $\pm$ 2,2 n=17
12,3 in vivo	34,9 $\pm$ 0,7 n=15	885 $\pm$ 75 n=15	59,9 $\pm$ 7,2 n=14	1181 $\pm$ 85 n=15	21,9 $\pm$ 4,1 n=14	--	--
12,3 in vitro	31,1 $\pm$ 0,4 n=16	649 $\pm$ 63 n=15	46,3 $\pm$ 6,1 n=15	819 $\pm$ 51 n=15	18,6 $\pm$ 4,3 n=13	251 $\pm$ 18 n=15	80,4 $\pm$ 3,0 n=17

Tabelle 4,3,1.

In vivo - in vitro-Vergleich der Kulturergebnisse von Rattenembryonen (Tag 10,3) nach 24 Stunden Kultur (Tag 11,3) und nach 48 Stunden Kultur (Tag 12,3)

* Bei den Eizylindern vom Tag 10,3 war eine ausreichend genaue Trennung in Embryo und Hülle nicht möglich.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Embryonen (Tag 10,3) für 24 Stunden (Tag 11,3) bzw. 48 Stunden (Tag 12,3) in 6ml Humanserum und 2ml Tyrode Phosphat-Puffer (insgesamt 8ml Medium) kultiviert.

Die Zahlen hinter n geben in der Spalte - Somiten - die Anzahl der ausgezählten Embryonen an, in den übrigen Spalten die Anzahl der bestimmten Proben. Bei den Protein- und DNA-Bestimmungen sind bei Embryonen vom Tag 10,3 jeweils 3, vom Tag 11,3 jeweils 2 Embryonen bzw. Hüllen, bei Embryonen vom Tag 12,3 je 1 Embryo bzw. 1 Hülle für die Bestimmung eingesetzt worden.

Die p-Werte als Ausdruck der signifikanten Unterschiede in vivo / in vitro sind in Symbolen angegeben :
a = p < 0,001; b = p < 0,01

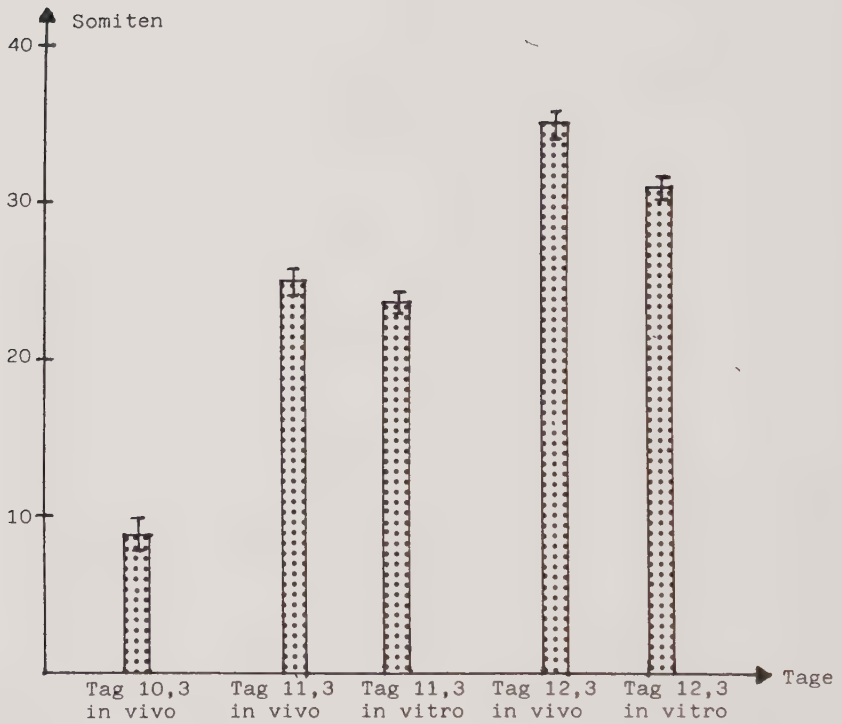


Abbildung 4.3.21.

In vivo - in vitro-Vergleich der Somitenzahl von Rattenembryonen an den Tagen 10,3; 11,3 und 12,3

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

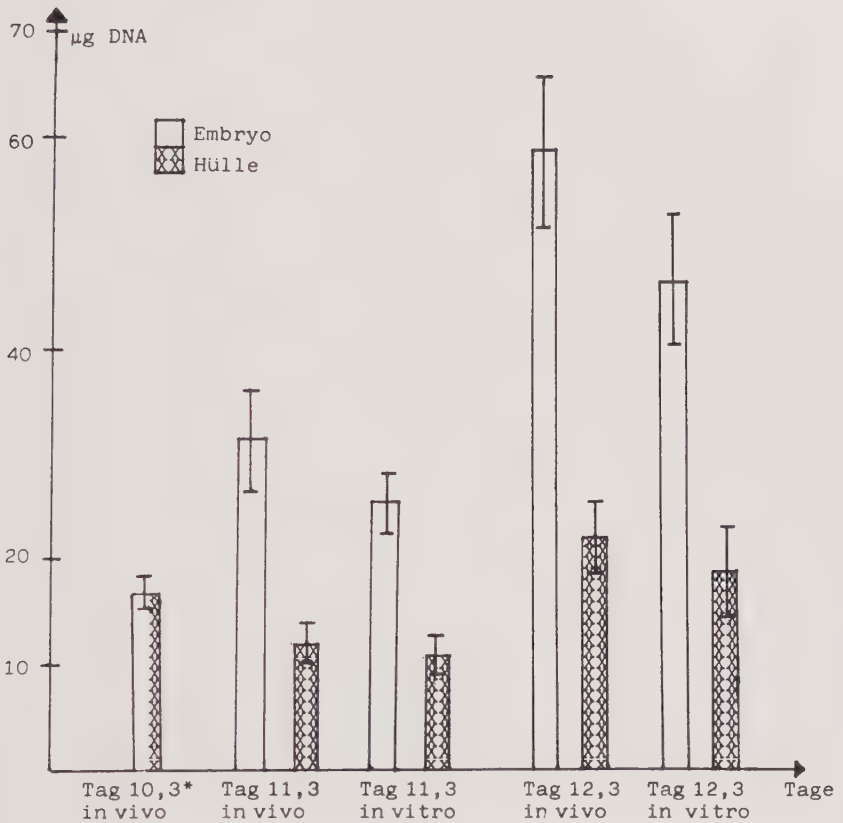


Abbildung 4.3.22.

In vivo - in vitro-Vergleich des DNA-Gehaltes von Rattenembryonen und deren Eihüllen an den Tagen 10,3; 11,3 und 12,3

* Bei den Eizylindern vom Tag 10,3 war eine ausreichend genaue Trennung in Embryo und Hülle nicht möglich.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

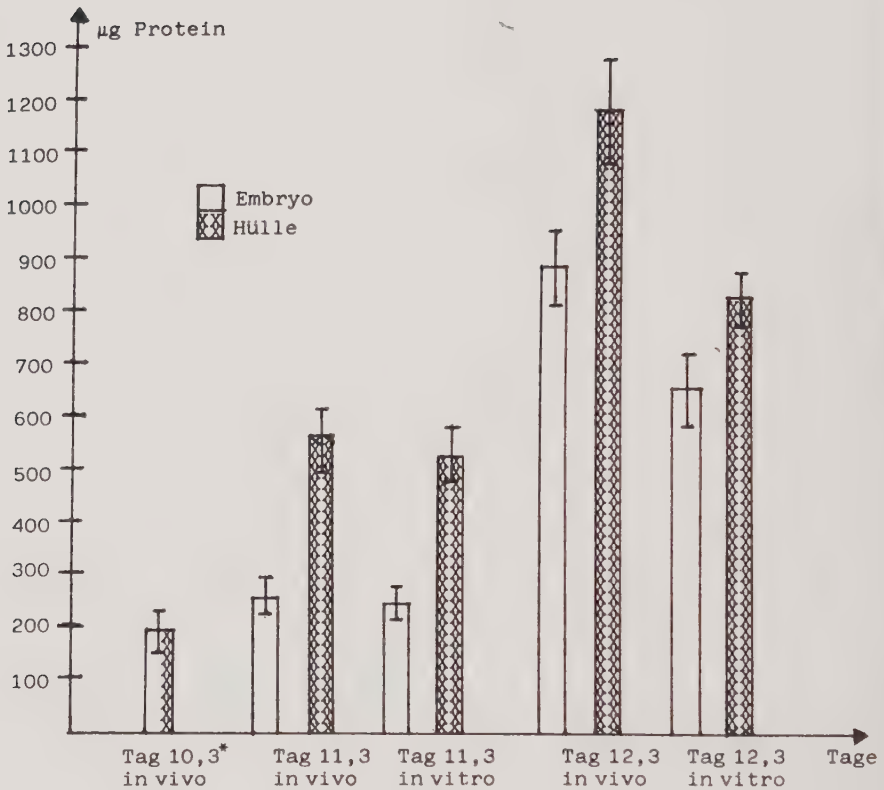


Abbildung 4.3.23.

In vivo - in vitro-Vergleich des Proteingehaltes von Rattenembryonen und deren Eihüllen an den Tagen 10,3; 11,3 und 12,3

* Bei den Eizylindern vom Tag 10,3 war eine ausreichend genaue Trennung in Embryo und Hülle nicht möglich.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24 Stunden bzw. 48 Stunden in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

4.3.3. Diskussion des in vivo - in vitro-Vergleichs

Bei der Einschätzung der Somitenbildung sowie der Protein- und DNA-Synthese durch 10,3 Tage alte Rattenembryonen in 48stündiger Kultur ist ein wesentlicher Gesichtspunkt zu berücksichtigen : Spätestens am Tag 11 ist bei der schwangeren Ratte die Placenta funktionsfähig und übernimmt entscheidende Aufgaben bei der Ernährung des Embryos.

Auch unter in vitro-Bedingungen wächst die Allantois an der Hinterwand des Dottersackes heran und verschmilzt mit dem Ektoplacentarkonus.

Trotzdem kommt es bei der in vitro-Entwicklung 10,3 Tage alter Rattenembryonen zu einer Minderentwicklung der Placenta und der sie versorgenden Gefäße (NEW, 1967).

Anstelle einer funktionierenden Placenta wuchern die dem Ektoplacentarkonus aufsitzenden Trophoblastriesenzellen und die Nabelgefäße obliterieren (NEW and COPOLLA, 1977).

Bemerkenswert ist, daß NEW (1967) im Schwanzbereich der in vitro gewachsenen Embryonen einen shunt beschreibt, der das Blut an arteria und vena umbilicalis vorbeifließen läßt. Durch diesen shunt wird das Blut ohne den Umweg über die Placenta im Gefäßsystem des Embryos belassen, und die Umbilicalgefäße obliterieren.

Die mangelnde Ausbildung der Placenta und der sie versorgenden Gefäße ist ursächlich dafür verantwortlich, daß eine Kultivierung von Rattenembryonen nach der Implantation über die Placentation hinaus nur beschränkt möglich ist.

Ein Entwicklungsstadium von 31 Somiten scheint hierbei die oberste Grenze des Möglichen zu sein.

Das Problem einer ungenügenden Placentabildung entfällt, wenn man die Kultur von Tag 10 bis Tag 11 betrachtet.

Während dieser Zeit erfolgt die Ernährung und der Gasaustausch der in vivo- wie auch in vitro-Embryonen über das Dottersackepithel (BECK and LLOYD, 1968; NEW and BRENT, 1972). Trotz der sehr mangelhaften Gefäßausstattung des Dottersackes unter in vitro-Bedingungen ist bei den Embryonen bis Tag 11,3 kein Entwicklungsrückstand und nur ein minimaler Wachstumsrückstand festzustellen.

Aus der gleichen Überlegung heraus ist es auch verständlich, daß es NEW et al.(1976) bei der Anzucht 9,5 Tage alter Rattenembryonen über 48 Stunden bis Tag 11,5 gelingt, sowohl hinsichtlich der Somitenbildung wie auch der Proteinsynthese mit in vivo-Verhältnissen vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

BERRY (1968) macht bei dem Vergleich des Proteingehaltes von in vivo und in vitro gewachsenen Embryonen die Beobachtung, daß mit steigender Somitenzahl der Unterschied im Proteingehalt zwischen in vivo- und in vitro-Embryonen wächst.

Bei einem Stadium von 31 Somiten - weiter konnte auch BERRY (1968) die Rattenembryonen nicht züchten - klaffen die in vitro- und in vivo-Angaben des Proteingehaltes am weitesten auseinander.

4.4. Kulturerfolg

4.4.1. Auflistung der Kulturergebnisse bei der Anzucht 10,3 Tage alter Rattenembryonen über 24 Stunden und 48 Stunden

Für die Einschätzung des Kulturerfolges wurden die Kulturergebnisse aus 48 Versuchsserien mit durchschnittlich 24-30 Embryonen pro Versuchsserie berücksichtigt.

Die Kulturdauer betrug im allgemeinen 48 Stunden. Um das Kulturergebnis nach 24 Stunden beurteilen zu können, wurde stichprobenweise für einige Flaschen je Versuchsserie nach 24 Stunden der Versuch abgebrochen, und die 11,3 Tage alten Rattenembryonen wurden makroskopisch und mikroskopisch untersucht.

Bei der Auflistung der Kulturergebnisse ergab sich, daß knapp ein Drittel aller Versuche mißlang, und ein gutes Drittel aller Versuche das gewünschte Ergebnis brachte.

Eine Versuchsserie wurde als mißlungen qualifiziert, wenn die Embryonen die ersten 24 Stunden Kultur nicht oder nur knapp überlebten (Tabelle 4.4.1., Nr. 1-3).

Das gewünschte Ergebnis bestand in einem in vitro-Wachstum über 48 Stunden, bei dem es zur Ausbildung von ca. 31 Somiten verbunden mit einer makroskopisch und mikroskopisch einwandfreien Entwicklung kam (Tabelle 4.4.1., Nr. 5).

Besonderes Augenmerk wurde bei der histologischen Untersuchung der in vitro gewachsenen Embryonen darauf gerichtet, ob die Embryonen vermehrt Nekrosen zeigten.

Hinsichtlich einer möglichen Nekrosenbildung wurde insbesondere das Neuroepithel untersucht.

Neben den mißlungenen Kulturen und den Kulturserien mit erwünschtem Ergebnis gab es noch Versuche, in denen sich die Embryonen während der ersten 24 Stunden normal bis zum Stadium E (23-24 Somiten) entwickelten, in den folgenden 24 Stunden aber nur noch ein minimales Wachstum von weniger als 4 Somiten zeigten (Tabelle 4.4.1., Nr. 4).

War nach 48stündiger Kultur bei diesen Embryonen außer einem Rückstand in der Somitenzahl makroskopisch nichts Auffälliges festzustellen, so ergab

die histologische Untersuchung den Befund zahlreicher Nekrosen besonders im Neuroepithel. Brach man bereits nach 24 Stunden bei diesen Serien den Versuch ab und untersuchte die soweit gewachsenen Embryonen, so waren keine Nekrosen festzustellen.

Auch die Überprüfung der Wachstumskinetik während der ersten 24 Stunden Kultur (vgl. Abbildung 4.6.2.) erbrachte den Nachweis einer normalen Entwicklung.

Diese in ihrem Ergebnis sehr differenziert zu betrachtenden Kulturversuche stellen das fehlende Drittel in der Erfolgsbilanz aus 48 Versuchsserien dar.

Nr.	Anzahl der Versuchsserien	prozentualer Anteil bezogen auf alle 48 Versuchsserien	Ergebnisse
1	3	6,3%	Embryonen starben in den ersten Stunden ab, Eihüllen* kollabierten gleichzeitig
2	7	14,6%	Embryonen* starben nach ungefähr 12 Stunden ab (15-17 Somiten), Hüllen wuchsen weiter und kollabierten nach ca. 36 Stunden
3	5	10,4%	Embryonen zeigten in den ersten 24 Stunden Kultur ein normales Wachstum (23-24 Somiten) starben aber in den folgenden Stunden ab
4	16	33,3%	Embryonen entwickelten sich in den ersten 24 Stunden normal (23-24 Somiten). Bei makroskopischer Untersuchung war kein Unterschied zu entsprechenden in vivo-Stadien feststellbar. Die histologische Untersuchung ergab keine Nekrosenbildung. In den nächsten 24 Stunden zeigten die Embryonen nur noch ein minimales Wachstum von weniger als 4 Somiten, starben aber nicht ab. Bei histologischer Prüfung war eine starke Nekrosenbildung besonders im Neuroepithel festzustellen.
5	17	35,4%	Embryonen wuchsen gleichmäßig und hatten nach 24 Stunden Kultur 23-24 Somiten. Nach weiteren 24 Stunden Kultur erreichten die Embryonen ein Stadium von durchschnittlich 31 Somiten. Die makroskopische und mikroskopische Untersuchung ergab gegenüber der in vivo-Entwicklung einen Rückstand von 3-4 Somiten, ansonsten hatten sich die Embryonen einwandfrei entwickelt. Auch bei sorgfältiger histologischer Prüfung waren keine Nekrosen zu finden.

Tabelle 4.4.1.

Auflistung der Kulturergebnisse von 48 Versuchsserien.

Es wurden Rattenembryonen am Tag 10,3 (8,9 + 1,6 Somiten) für 48 Stunden in 6ml Humanserum und 2ml Tyrode Phosphat-Puffer (8ml Medium) kultiviert. In jede 50ml Penicillinflasche kamen in 8ml Kulturmedium 3 Embryonen. Im Rahmen einer Versuchsserie wurden 24-30 Embryonen in die Kultur gegeben.

* Kriterien für das Absterben eines Embryos in Kultur sind sowohl Kollabieren der Eihüllen als auch fehlender Herzschlag.

4.4.2. Diskussion des Kulturerfolges

Bei der Beurteilung dieser Erfolgsbilanz - statistisch gesehen gelingt nur jeder dritte Versuch -, ist zu beachten, daß die whole embryo culture in Phasen verläuft.

Auf Zeiten, in denen nur wenig befriedigende Kulturergebnisse zu erlangen sind, folgen lange Zeiträume, in denen sich die Embryonen über 48 Stunden bestens entwickeln. Befindet sich die Kultur in einer guten Phase, so ist damit zu rechnen, daß auch die nächsten Kulturergebnisse gut ausfallen werden. Innerhalb einer Kulturserie verhalten sich die Embryonen - von Einzelfällen abgesehen - gleichmäßig. Es ist also nicht so, daß man ständig mit der ganzen Bandbreite der in der Tabelle 4.4.1. aufgeführten Ergebnisse konfrontiert ist.

Wichtig ist, daß man die Kultur unter Kontrolle hat, das heißt, man muß wissen, welches Wachstum jeweils zu erwarten ist.

Entwickeln sich die Embryonen in Kultur nur über 24 Stunden normal (Nr. 4 der Tabelle 4.4.1.), so wird man keine Testung eines Pharmakons über 48 Stunden durchführen können.

Ein Wachstum über 24 Stunden (von Tag 10,3 auf Tag 11,3) reicht voll aus, um die Drehung der Embryonen, die Verschmelzung der Neuralfalten, die Ausbildung des Ohrbläschens sowie den Schluß des vorübergehend mit dem Amnion kommunizierenden neuroporus anterior zu beobachten.

MIRKES et al.(1981) arbeiten mit einer whole embryo cultur über 24 Stunden von Tag 10 auf Tag 11 und zeigen die Embryotoxizität von Cyclophosphamidmetaboliten.

Nach ebenfalls 24 Stunden Kultur (Tag 10 bis Tag 11) untersuchen FANTEL et al.(1979) den Einfluß von in vitro aktiviertem Cyclophosphamid auf das Wachstum von Rattenembryonen.

Die Möglichkeit, mit dialysiertem Serum Rattenembryonen in Kultur zu züchten, untersucht GUNBERG (1976), indem er Rattenembryonen von Tag 10 auf Tag 11 wachsen läßt.

Diese Beispiele verdeutlichen, daß eine whole embryo culture über 24 Stunden (Tag 10,3 bis 11,3) durchaus für die Beantwortung einiger Fragestellungen geeignet ist.

In einem Zeitraum von zweieinhalb Jahren war es uns möglich, mehr als 500 Embryonen des Tages 10,3 nach 48 Stunden Kultur auf über 30 Somiten zu züchten.

Die zahlreichen Veröffentlichungen über die whole embryo culture anderer Labors geben nur selten Auskunft über die Erfolgsbilanz ihrer Kulturversuche. Bei vielen Autoren muß man den Eindruck haben, sie hätten stets und zu jeder Zeit gleichbleibend gute Kulturerfolge.

Eine Ausnahme macht NEW (1967) bei der Beschreibung der Entwicklung von Rattenembryonen mit 7-15 Somiten bei Kulturbeginn in einem "circulating medium".

NEW (1967) setzt die Somitenentwicklung mit dem prozentualen Anteil der Embryonen, die das entsprechende Somitenstadium erreicht haben, in Form einer Kurve in Beziehung.

Man erkannte, daß NEW (1967) knapp 50% der kultivierten Embryonen auf ein 31-Somitenstadium züchten kann.

24-25 Somiten erreichen noch 80% der Embryonen.

Hierbei ist zu beachten, daß die Methode des "circulating mediums" ein sehr aufwendiges und jedem einzelnen Embryo viel Beachtung schenkendes Verfahren ist (vgl. S 21).

Lassen NEW et al.(1973) 10,5 Tage alte Rattenembryonen in "rotating tubes" wachsen, so erreichen sie unter ihren Bedingungen kein Wachstum von über 30 Somiten, sondern die Embryonen bleiben bei durchschnittlich 28 Somiten

in ihrer Entwicklung stehen. Über die Erfolgsbilanz dieser Versuche machen NEW et al.(1973) keine Angaben.

4.5. Stoffwechsel der Embryonen in Kultur

4.5.1 Glukoseverbrauch und Lactatbildung während 24- und 48stündiger Kultur 10,3 Tage alter Rattenembryonen (vgl. Tabelle 4.5.1.-4.5.3. und Abbildung 4.5.1.-4.5.2.)

Am ersten Tag der Kultur verbraucht ein 10,3 Tage alter Rattenembryo 1,9mg Glukose. Die Lactatbildung liegt während des gleichen Zeitraums bei 1,4mg pro Embryo.

Innerhalb des Kulturmediums fällt die Glukosekonzentration von 364mg% auf 297mg%; der Lactatspiegel steigt gleichzeitig von 10mg% auf knapp 64mg%.

Während am 2. Tag der Kultur der Glukoseverbrauch auf 1,2mg und die Lactatbildung auf 0,46mg pro Embryo fallen, steigen von Tag 11,3 auf 12,3 gegenüber dem Vortag Protein- und DNA-Synthese.

Glukose- und Lactatkonzentrationen im Medium liegen nach 48stündiger Kultur bei 250mg% Glukose und 80mg% Lactat.

An Protein bildet ein Embryo in der Zeit von Tag 10,3 auf Tag 11,3 knapp 580µg, in den folgenden 24 Stunden wächst die Proteinsynthese auf 700µg an.

Bei der DNA-Bildung ist ein noch deutlicherer Anstieg zwischen Tag 1 und Tag 2 der Kultur zu verzeichnen : Die DNA-Synthese steigt von 19µg auf knapp 29µg DNA pro Embryo an.

Setzt man Glukoseverbrauch und Lactatbildung sowie Protein- und DNA-Bildung miteinander in Beziehung, so zeichnet sich folgendes ab : In der Entwicklungsphase von Tag 11,3 auf Tag 12,3 sinkt der Glukoseverbrauch bezogen auf die DNA-Synthese auf 40% des Vortages.

Vergleicht man den Glukoseverbrauch mit der Proteinzunahme, so liegen die Verhältnisse ähnlich : In den ersten 24 Stunden Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 metabolisieren die Rattenembryonen in Kultur doppelt so viel Glukose wie in den folgenden 24 Stunden.

Bei der Lactatbildung sind die Unterschiede zwischen 1. und 2. Kulturtag noch deutlicher : In der Entwicklungsphase von Tag 11,3 auf 12,3 produzieren die Rattenembryonen nur noch 20% (bezogen auf DNA) bzw. 25% (bezogen auf Protein) der Lactatmenge, die sie noch während der Entwicklungsphase von Tag 10,3 auf Tag 11,3 bilden.

Der Anteil der Glukose, der zu Lactat metabolisiert wird, sinkt am 2. Tag der Kultur gegenüber den ersten 24 Stunden um die Hälfte von 74% (bezogen auf DNA) bzw. 73% (bezogen auf Protein) auf 38%.

Kultur- dauer (h)	Somiten- entwicklung	Protein- zunahme (μ g)	DNA- Zunahme (μ g)	Glukose- verbrauch (mg)	Lactat- bildung (mg)	Lactat- bildung (μ mol)
24h von Tag 10,3 auf Tag 11,3	von 8,9 $\pm$ 1,6 auf 23,7 $\pm$ 0,7	578 $\pm$ 42	19,1 $\pm$ 3,5	1,89 $\pm$ 0,17	1,39 $\pm$ 0,08	15,4 $\pm$ 0,9
24h von Tag 11,3 auf Tag 12,3	von 23,7 $\pm$ 0,7 auf 31,1 $\pm$ 0,4	705 $\pm$ 55	28,7 $\pm$ 6,2	1,19 $\pm$ 0,1	0,46 $\pm$ 0,05	5,0 $\pm$ 0,5

Tabelle 4.5.1.

Vergleich der Protein- und DNA-Zunahme mit dem Glukoseverbrauch und der Laktatbildung nach jeweils 24stündiger Kultur eines Rattenembryos und seiner Eihüllen von Tag 10,3 auf 11,3 und von Tag 11,3, auf Tag 12,3.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24 Stunden und 48 Stunden in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

Kultur- dauer	Somiten entwicklung	Glukoseverbrauch (μmol)/ Protein(μg)	Laktatbildung (μmol)/ Protein(μg)	prozentualer Anteil der Glukose, der zu Laktat metabolisiert wird
24h von Tag 10,3 auf Tag 11,3	von $8,9^{+1,6}$ auf $23,7^{+0,7}$	$18,15 \pm 0,25$	$26,7 \pm 0,4$	73%
24h von Tag 11,3 auf Tag 12,3	von $23,7^{+0,7}$ auf $31,1^{+0,4}$	$9,35 \pm 0,05$	$7,1 \pm 0,1$	38%

Tabelle 4.5.2

Glukoseverbrauch und Laktatbildung bezogen auf die Proteinzunahme eines Rattenembryos und seiner Eihüllen während 24stündiger Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 und von Tag 11,3 auf Tag 12,3

Bei den in vitro Versuchen wurden Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24h und 48h in einem Kultur-medium aus Humanserum und Tyrode-Phosphat Puffer (3:1) kultiviert

Kultur- dauer	Somit- entwicklung	Glukoseverbrauch (μmol)/DNA (μg)	Laktatbildung (μmol)/DNA (μg)	prozentualer Anteil der Glukose, der zu Laktat metabolisiert wird
24h von Tag 10,3 auf Tag 11,3	von 8,9 $\pm$ 1,6 auf 23,7 $\pm$ 0,7	560 $\pm$ 56	825 $\pm$ 104	74%
24h von Tag 11,3 auf Tag 12,3	von 23,7 $\pm$ 0,7 auf 31,1 $\pm$ 0,4	237 $\pm$ 34	179 $\pm$ 21	38%

Tabelle 4.5.3

Glukoseverbrauch und Laktatbildung bezogen auf die DNA-Zunahme eines Rattenembryos und seiner Eihüllen während 24stündiger Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 und von Tag 11,3 auf Tag 12,3

Bei den in vitro Versuchen wurden Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24h und 48h in einem Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode-Phosphat Puffer (3:1) kultiviert

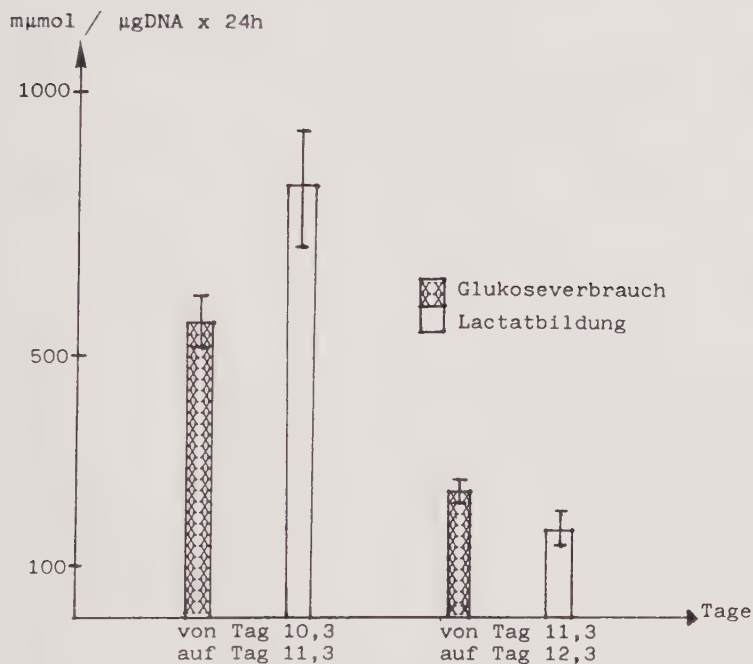


Abbildung 4.5.2

Glukoseverbrauch und Lactatbildung bezogen auf die DNA-Zunahme eines Rattenembryos und seiner Eihüllen (Tag 10,3) während 24stündiger Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 und von Tag 11,3 auf Tag 12,3

Bei den in vitro Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24h und 48h in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode-Phosphat Puffer(3:1) kultiviert

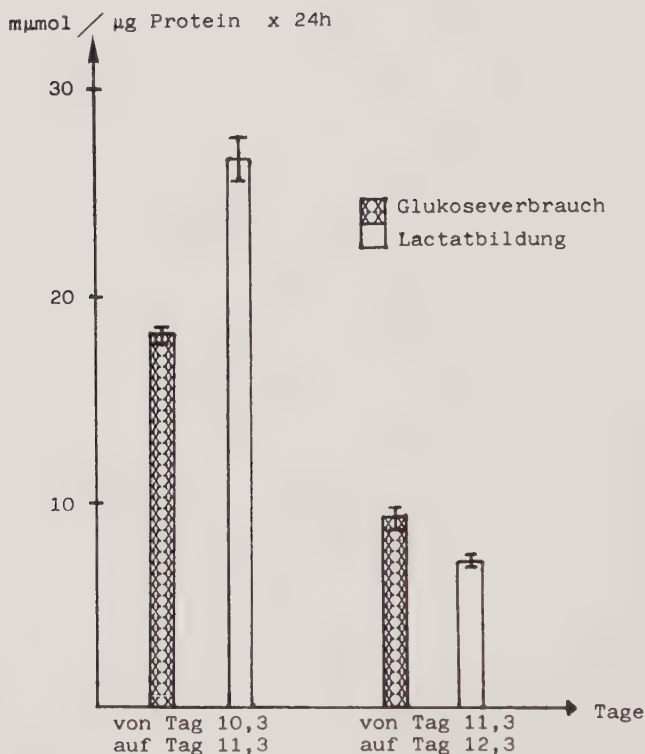


Abbildung 4.5.1

Glukoseverbrauch und Lactatbildung bezogen auf die Proteinzunahme eines Rattenembryos und seiner Hüllen (Tag 10,3) während 24stündiger Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 und von Tag 11,3 auf Tag 12,3

Bei den in vitro Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) für 24h und 48h in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode-Phosphat Puffer(3:1) kultiviert

4.5.2. Diskussion des Glukoseverbrauchs und der Lactatbildung während 24- und 48stündiger Kultur 10,3 Tage alter Rattenembryonen

Betrachtet man den Abfall des Glukoseverbrauchs am 2. Tag gegenüber dem 1. Tag der Kultur, so ist zuerst zu prüfen, ob das Absinken des Glukoseverbrauchs durch einen Glukosemangel während der letzten 24 Stunden der Kultur bedingt ist.

Mit 251mg% befindet sich die Glukosekonzentration im Medium nach 48 Stunden Kultur noch weit über den physiologischen Werten von ca. 180mg%, die man normalerweise bei der Ratte findet. Ein Glukosemangel kann also mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Eine vergleichbare Entwicklung hinsichtlich des Glukoseverbrauchs beschreiben NEUBERT et al.(1971) bei der Untersuchung des Glukose-Stoffwechsels von 11 und 12 Tage alten Rattenembryonen. NEUBERT et al.(1971) können nachweisen, daß sich der Glukoseverbrauch (bezogen auf DNA) von Rattenembryonen von Tag 11 auf Tag 12 um annähernd 80% verringert.

Bei der Einordnung dieses Ergebnisses ist zu beachten, daß NEUBERT et al.(1971) den Glukoseverbrauch auf die gesamte DNA eines Embryos beziehen, während in dieser Arbeit Glukoseverbrauch und Lactatbildung mit neugebildeter DNA ins Verhältnis gesetzt werden.

Ein weiterer Unterschied liegt in der Versuchsanordnung.

Während NEUBERT et al.(1971) nackte, das heißt hüllenlose Embryonen für nur wenige Minuten in einem chemisch definierten Medium mit C^{14} -markierter Glukose inkubierten, wuchsen in der vorliegenden Arbeit Rattenembryonen in ihren intakten Eihüllen für 48 Stunden in Humanserum.

Ebenfalls den Glukoseverbrauch und die Lactatbildung bei 10, 11 und 12 Tage alten Rattenembryonen haben TANIMURA und SHEPARD (1970) bestimmt. Hierzu wurden Rattenembryonen in ihren Eihüllen für 3 Stunden in Humanserum mit zugesetzter und markierter Glukose angezüchtet.

TANIMURA und SHEPARD (1970) beziehen Glukoseverbrauch und Lactatbildung auf den Proteingehalt der Embryonen und erhalten am Tag 12 einen Abfall des Glukoseverbrauchs um 60% auf 40% gegenüber Tag 10 (100%).

Durch die verschiedenen Bezugsgrößen (DNA und Protein) sowie durch die unterschiedlichen Versuchsanordnungen sind die prozentualen Angaben nicht unmittelbar miteinander vergleichbar; trotzdem weisen alle Ergebnisse darauf hin, daß während der Embryonalentwicklung der Ratte von Tag 10 auf Tag 12 der Glukoseverbrauch drastisch abnimmt.

Bei Betrachtung der Lactatproduktion zeigt sich, daß die Laktatbildung während der 48stündigen Kultur stärker abfällt als der Glukoseverbrauch.

Sinkt der Glukoseverbrauch am 2. Tag der Kultur gegenüber dem 1. Tag um ca. 60%, so bilden die Rattenembryonen in der Entwicklungsphase von Tag 11,3 auf Tag 12,3 unter in vitro-Bedingungen nur noch 20%-25% der Lactatmenge des Vortages.

Bei NEUBERT et al.(1971) liegt der Abfall der Lactatproduktion von Tag 11 auf Tag 12 bei 80%; um 70% verringert sich die Lactatbildung von Tag 10 (100%) auf Tag 12 bei TANIMURA und SHEPARD (1970).

Bei rapide gesunkenem Glukoseverbrauch und noch stärker eingeschränkter Lactatbildung steigt die Proteinzunahme am 2. Tag der Kultur um annähernd 20%.

Gleichzeitig halbiert sich der prozentuale Anteil der verbrauchten Glukose, der von den Rattenembryonen zu Lactat metabolisiert wird, von 74% bzw. 73% auf 38%.

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß sich in der Entwicklungsphase von Tag 11,3 auf Tag 12,3 der Glukosemetabolismus gegenüber dem Vortag auch qualitativ geändert haben muß.

TANIMURA und SHEPARD (1970) können ebenfalls - im Gegensatz zu NEUBERT et al.(1971) - von Tag 10 auf Tag 12 ein Sinken des Anteils an Glukose, der zu Lactat verstoffwechselt wird, feststellen.

TANIMURA und SHEPARD (1970) folgern aus ihren Ergebnissen, daß im Laufe der Organogenese die Bedeutung des Zitratzyklus, der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung beim Glukosemetabolismus zunimmt.

TANIMURA und SHEPARD (1970) vergleichen den Glukosemetabolismus der Rattenembryonen im frühen Somitenstadium bis Tag 11 mit dem Glukosemetabolismus eines erschöpften Muskels: In sauerstoffunabhängiger Reaktion gewinnt der erschöpfte Muskel bei unzureichender Sauerstoffversorgung einen Teil des nötigen ATP's über die Glycolyse, wobei Lactat als Endprodukt gebildet wird.

Auffallend ist, daß am Tag 11 - gleichzeitig mit der angenommenen qualitativen Änderung des Glukosemetabolismus - in vivo die Placentation beginnt.

Es wäre zu überlegen, ob das Einwachsen der Allantois in den Ektoplacentarkonus und die Ausbildung der dazugehörigen Blutgefäße zumindest kurzfristig auch in vitro eine Umstellung des Glukosemetabolismus am 2. Tag der Kultur auf mehr aerobe Verhältnisse induzieren.

Diese Überlegung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von NEUBERT et al.(1971), die keine qualitative Änderung des Glukosemetabolismus von Tag 11 auf Tag 12 feststellen konnten.

Weiterhin kann die Überlegung angestellt werden, zwischen wirklich metabolisierter und nur in den Dottersack aufgenommener Glukose zu unterscheiden.

Der starke Abfall der Lactatproduktion im Verhältnis zum Glukoseverbrauch am Tag 12 kann darin seinen Grund haben, daß unter in vitro-Bedingungen die Metabolisierungsaktivitäten von Embryo und Hüllen sinkt, während die Resorptionsleistung des Dottersackepithels unverändert bestehen bleibt.

Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Verfahren, durch Bestimmung von Glukose und Lactat im Medium Auskunft über den Stoffwechsel der Embryonen in Kultur zu erhalten, ist nicht geeignet, subtile Fragestellungen hinsichtlich der Bedeutung anderer Metabolisierungswege wie z.B. des 'Pentosephosphatzylus' zu beantworten. Zweifellos ist diese Methode der einfachste Weg, den Glukoseverbrauch und die Lactatbildung bei Embryonen im Stadium der Organogenese zu bestimmen.

Als nächster Schritt böte sich an, mit markierter Glukose die Versuche zu wiederholen, um so z.B. den Anteil der metabolisierten Glukose von der nur in den Dottersack aufgenommenen Glukose unterscheiden zu können.

4.6. Die in vitro-Entwicklung der Somitenzahl bei Rattenembryonen in Abhängigkeit von den angelegten Somiten bei Kulturbeginn (vgl. Abbildung 4.6.1.-4.6.2.)

Beim Vergleich der Somitenzahl zeigten die Embryonen am Tag 10,3 große Entwicklungsunterschiede.

Aus zehn schwangeren Ratten konnten Embryonen mit nur 5 Somiten, aber auch Embryonen mit bereits 14 Somiten präpariert werden.

Die gleichen Unterschiede in der Somitenzahl beschreiben OTIS and BRENT (1950) bei Mäuseembryonen: Am Tag 9 (das entspricht dem Tag 10,5 bei der Ratte) hatten die Mäuse zwischen 9 und 17 Somiten.

Rattenembryonen mit 5 Somiten befinden sich im Stadium A (vgl. S. 37) und haben sich noch nicht gedreht. Mit 14 Somiten ist die Drehung beinahe abgeschlossen, die Entwicklung der Embryonen hat bereits das Stadium C überschritten; Herz und Hirnbläschen sind deutlich zu erkennen (vgl. S. 39).

Bei unseren ersten Kulturversuchen wurde jeder erfolgreich präparierte Eizylinder in die Kultur gegeben; Embryonen aus den Stadien A bis C kamen zusammen in ein Kulturgefäß. Nach 48 Stunden war nicht mehr zu erkennen, welcher Embryo anfangs weniger und welcher mehr Somiten gehabt hatte; alle Embryonen hatten das 31-Somitenstadium erreicht.

Wir vermuteten, daß die Embryonen kontinuierlich gewachsen waren und bei 31 Somiten ihre Entwicklung eingestellt hatten.

Unsere Vorstellung war, daß Embryonen mit einer größeren Somitenzahl zu Kulturbeginn in weniger als 48 Stunden das 31-Somitenstadium erreichten; nach unserer Theorie benötigten Embryonen mit einer anfänglich geringeren Somitenzahl die vollen 48 Stunden, um den gleichen Entwicklungsgrad zu erlangen.

Zur Bestätigung unserer Überlegungen untersuchten wir in mehreren Versuchsserien die Wachstumskinetik der Embryonen in Kultur.

Hierzu gaben wir jeweils Embryonen mit gleicher Somitenzahl in ein Kulturgefäß und zählten nach 12, 16, 18, 20, 40 und 48 Stunden die Somiten der in vitro gewachsenen Embryonen aus.

Zu unserer Überraschung verhielten sich die Embryonen während ihrer in vitro-Entwicklung völlig anders als vermutet: Die Embryonen erreichten unabhängig von ihrer ursprünglichen Somitenzahl nach spätestens 20 Stunden das gleiche Somitenstadium (18-20 Somiten).

Von da an entwickelten sich die Embryonen gleichmäßig und hatten nach 48 Stunden durchschnittlich 31 Somiten.

Bei 33% aller Versuchsserien gelang es uns nur, die Embryonen über 24 Stunden erfolgreich anzuzüchten (vgl. S. 58).

In der Entwicklungsphase von Tag 10,3 auf Tag 11,3 zeigten die Embryonen eine mit den in vivo-Kontrollen vergleichbare Entwicklung; am 2. Tag der Kultur blieben die Rattenembryonen in Entwicklung und Wachstum stehen (vgl. Nr. 4 in Tabelle 4.4.1.).

Bei der Untersuchung der in vitro-Entwicklung der Somitenzahl von Tag 10,3 auf Tag 11,3 zeigte sich, daß diese Embryonen nach spätestens 20 Stunden Kultur unabhängig von ihrer ursprünglichen Somitenzahl in der Entwicklung gleichgezogen hatten; nach 24stündiger Kultur erreichten die Embryonen das 23-24-Somitenstadium.

Während des 1. Kulturtages besteht somit kein Unterschied in der Entwicklung der Somitenzahl zwischen Embryonen mit einer erfolgreichen Differenzierung über 48 Stunden und Embryonen mit einem Wachstum über nur 24 Stunden.

Eine schlüssige Erklärung für die Entwicklung der Somitenzahl unter in vitro-Bedingungen kann nicht gegeben werden.

Bemerkenswert ist, daß der Zeitpunkt zu dem alle Embryonen verschiedener Ausgangsstadien den gleichen Differenzierungsgrad erreichen, mit der Placentation in vivo zusammenfällt.

Bedeutung hat die Untersuchung der Wachstumskinetik für die Beurteilung von Entwicklungsrückständen : Mit Hilfe der Abbildung 4.6.1. und 4.6.2. kann der Zeitraum abgeschätzt werden, zu dem ein in seiner Entwicklung zurückgebliebener Embryo seine Entwicklung verlangsamt oder eingestellt hat.

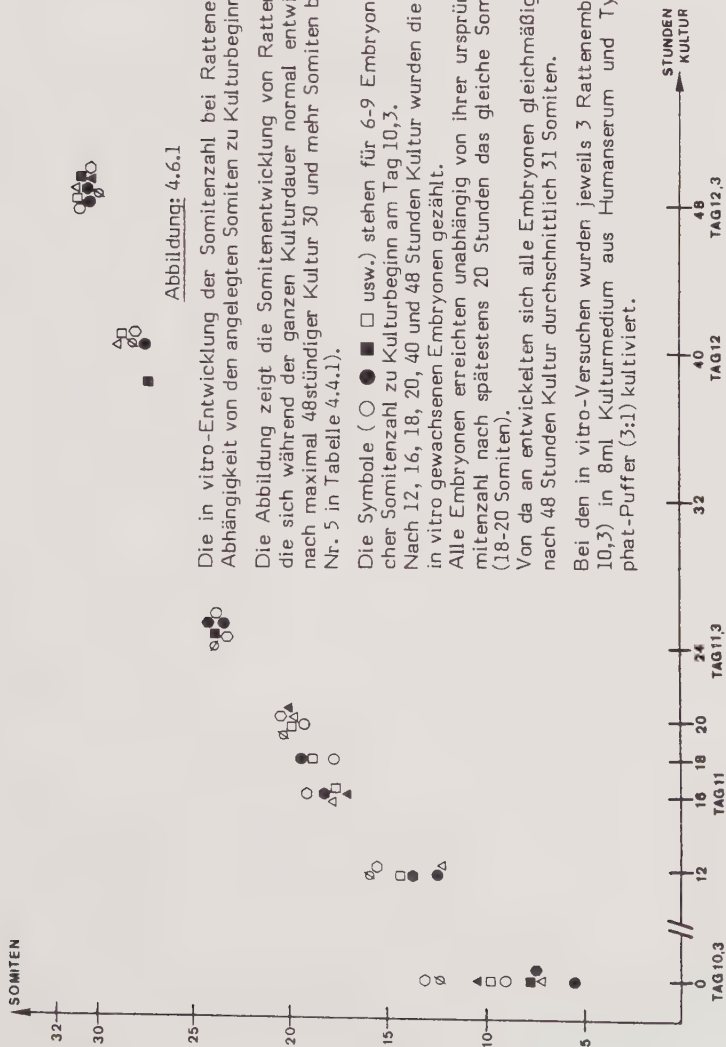


Abbildung: 4.6.1

Die in vitro-Entwicklung der Somitenzahl bei Rattenembryonen in Abhängigkeit von den angelegten Somiten zu Kulturbeginn.

Die Abbildung zeigt die Somitenentwicklung von Rattenembryonen, die sich während der ganzen Kulturdauer normal entwickelten und nach maximal 48stündiger Kultur 30 und mehr Somiten bildeten (vgl. Nr. 5 in Tabelle 4.4.1).

Die Symbole (○ ● ■ □ usw.) stehen für 6-9 Embryonen mit gleicher Somitenzahl zu Kulturbeginn am Tag 10,3.

Nach 12, 16, 18, 20, 40 und 48 Stunden Kultur wurden die Somiten der in vitro gewachsenen Embryonen gezählt.

Alle Embryonen erreichten unabhängig von ihrer ursprünglichen Somitenzahl nach spätestens 20 Stunden das gleiche Somitenstadium (18-20 Somiten).

Von da an entwickelten sich alle Embryonen gleichmäßig und hatten nach 48 Stunden Kultur durchschnittlich 31 Somiten.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

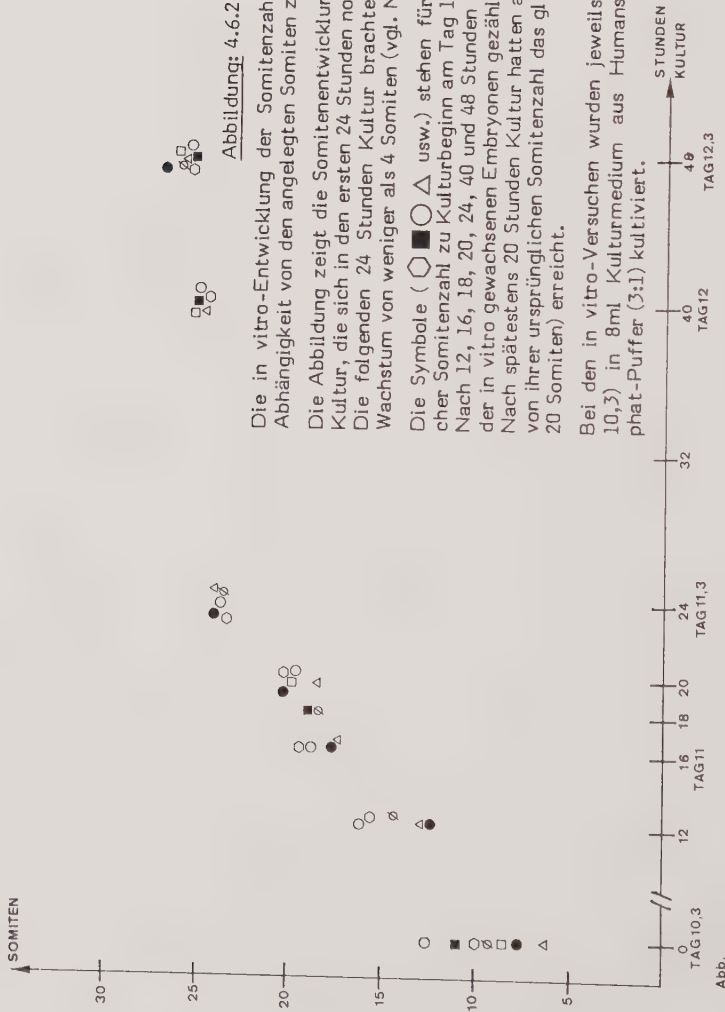


Abbildung: 4.6.2

Die in vitro-Entwicklung der Somitenzahl bei Rattenembryonen in Abhängigkeit von den angelegten Somiten zu Kulturbeginn.

Die Abbildung zeigt die Somitenentwicklung bei Rattenembryonen in Kultur, die sich in den ersten 24 Stunden normal entwickeln. Die folgenden 24 Stunden Kultur brachten nur noch ein minimales Wachstum von weniger als 4 Somiten (vgl. Nr. 4 in Tabelle 4.4.1).

Die Symbole (○, ◻, △ usw.) stehen für 3-9 Embryonen mit gleicher Somitenzahl zu Kulturbeginn am Tag 10,3.

Nach 12, 16, 18, 20, 24, 40 und 48 Stunden Kultur wurden die Somiten der in vitro gewachsenen Embryonen gezählt.

Nach spätestens 20 Stunden Kultur hatten alle Embryonen unabhängig von ihrer ursprünglichen Somitenzahl das gleiche Somitenstadium (17-20 Somiten) erreicht.

Bei den in vitro-Versuchen wurden jeweils 3 Rattenembryonen (Tag 10,3) in 8ml Kulturmedium aus Humanserum und Tyrode Phosphat-Puffer (3:1) kultiviert.

5. EINFLUSS VON THALLIUM AUF DIE IN VITRO-ENTWICKLUNG VON RATTENEMBRYONEN

5.1. EINLEITUNG

5.1.1. Allgemeine Einführung

Über die Embryotoxizität und Teratogenität von Thallium gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Ansichten : Fruchtschädigungen bei der Maus mit "contergan-ähnlichem Erscheinungsbild" verursacht durch Thallium beschreiben ACHENBACH et al.(1979a,b).

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu eingehenden Untersuchungen von GIBSON et al.(1967) sowie von GIBSON and BECKER (1970), die nachweisen konnten, daß Thallium so gut wie keinen Einfluß auf die Embryonal- und Fetalentwicklung der Maus nimmt.

GIBSON and BECKER (1970) konnten allein bei Rattenfeteten, deren Muttertiere mit Thallium behandelt worden waren, in Einzelfällen nicht ossifizierte Wirbelkörper und Hydronephrosen beobachten.

Den Arbeiten von ACHENBACH et al.(1979a,b) folgte eine neuerliche Untersuchung von CLAUSSEN et al.(1981), die die Ergebnisse von GIBSON and BECKER (1970) weitgehend bestätigte : Ratten sind gegenüber Thallium empfindlicher als Mäuse.

Neben einer leichten Erhöhung der postimplantativen Verluste konnten Retardierungen bei der Skelettbildung - in Form von hantelförmigen Brustwirbelkernen - festgestellt werden.

Die Placentagängigkeit von Thallium wird als sehr gering eingeschätzt. GIBSON et al.(1967) konnten bei der Ratte am Tag 20 fetale Thalliumkonzentrationen messen, die nur 1/15 bis 1/30 der mütterlichen Werte ausmachten.

Insgesamt kommen CLAUSSEN et al.(1981) zu der Überzeugung, daß den applizierten Thalliumsalzen bei Ratte und Maus keine embryotoxische oder teratogene Wirkung zugesprochen werden kann.

Unbestritten ist die Embryotoxizität von Thallium beim Hühnchenembryo. KARNOFSKY et al.(1950) sowie HALL (1972, 1976) konnten beim Hühnchenembryo eine durch Thallium hervorgerufene Achondroplasie verbunden mit reduziertem Wachstum der langen Röhrenknochen und Arealen nekrotischen Blasenknorpels nachweisen.

Es gilt also, zwischen der teratogenen Wirkung des Thalliums beim Hühnchen und den durch Thallium hervorgerufenen diskreten Veränderungen bei der Ratte, die mehr im Sinne einer Retardierung zu deuten sind (CLAUSSEN et al., 1981) zu unterscheiden.

Ein denkbarer Grund für die geringe Embryotoxizität des Thalliums bei der Ratte könnte der stark eingeschränkte Placentatransfer sein.

5.1.2. Fragestellung der Thallium-Versuche

Mit Hilfe der whole embryo culture sollte das embryotoxische Potential von Thallium untersucht werden.

10,3 Tage alte Rattenembryonen wurden über 24 Stunden und 48 Stunden in einem Kulturmedium, dem definierte Mengen eines Thalliumsalzes zugesetzt waren, kultiviert.

Mit dieser Versuchsanordnung konnte der unmittelbare Einfluß von Thallium auf die Embryonalentwicklung der Ratte untersucht werden; die Verteilung des Thalliums innerhalb des Muttertieres sowie die Verteilung zwischen Muttertier und Embryo blieben hierbei unberücksichtigt.

5.2. Methoden

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten verwandt.

Kulturmethode und Kulturbedingungen entsprachen den zuvor beschriebenen Vorschriften.

Die Embryonen wuchsen in einem Medium, das aus 3 Teilen Humanserum und 1 Teil Tyrode Phosphat-Puffer bestand. Unter leichtem Erwärmen wurde Thallium-I-acetat (Firma Merck, Darmstadt, p.a. Ware) in Lösung II des Tyrode Phosphat-Puffers (vgl. Punkt 2.3.2.) gelöst, so daß im Kulturmedium Thalliumendkonzentrationen von 1µg, 3µg, 10µg, 30µg und 100µg Thallium (nicht Thalliumacetat) pro Milliliter vorlagen (vgl. Punkt 2.3.2.).

Für die Mikroskopie wurden die Embryonen wie unter Punkt 2.8. beschrieben vorbehandelt.

Die DNA wurde nach der Methode von BURTON (1956) bestimmt (vgl. Punkt 2.5.).

Protein, Glukose und Lactat wurden in dem Enzymautomaten ABA-100 (Firma Abbott, USA) bestimmt (vgl. Punkt 2.5.-2.7.).

5.3. Ergebnisse

5.3.1. Vorbemerkung

Die whole embryo culture 10,3 Tage alter Rattenembryonen gelingt nur über einen Zeitraum von 48 Stunden.

Dementsprechend haben die Rattenembryonen auch nur 48 Stunden Zeit, auf ein embryotoxisches Agens zu reagieren.

48 Stunden sind im Vergleich zur ganzen Gestationszeit ein kurzer Abschnitt.

Mißbildungen, die durch embryotoxische Substanzen verursacht werden, benötigen in der Regel einen längeren Zeitraum, um makroskopisch sichtbar zu werden.

In der Zeit von Tag 10 bis Tag 12 befindet sich der Rattenembryo in einem Stadium, in dem viele Organe angelegt werden und sich zu entwickeln beginnen.

An Organanlagen, die zu Beginn der Kultur mikroskopisch klein sind, werden nach 48stündiger Kultur keine makroskopisch erkennbaren Mißbildungen zu erwarten sein.

Anstelle von makroskopisch sichtbaren Mißbildungen kann man nach Vorstufen solcher Veränderungen in Form von Wachstums- und Differenzierungsstörungen fahnden; hierzu müssen die Embryonen mikroskopisch untersucht werden.

Aus diesen Überlegungen heraus beschränkten wir uns bei der Suche nach Thalliumeffekten nicht auf eine makroskopische Inspizierung der in vitro gewachsenen Rattenembryonen, sondern unterzogen die Embryonen einer genauen histologischen Untersuchung.

5.3.2. Ergebnisse nach 24 Stunden Kultur

100µg Thallium/ml Medium;
nach 24 Stunden Kultur

Bereits nach 24 Stunden Kultur waren die Embryonen so mißgestaltet, daß die Somiten nicht mehr exakt auszählbar waren.

Auf der Abbildung 5.3.2.2. sind zwischen 16 und 17 Somiten zu erkennen.

Der Schwanz ist plump und verkürzt.

Deutlich zu erkennen ist, daß sich der Embryo noch gedreht hat.



Kontrolle

Abbildung 5.3.2.1.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro

Stadium E (25 Somiten)

nach 24 Stunden Kultur ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B)

(Ec) = Ectoplacentarkonus

Die Anlagen des 1. und 2. Kiemenbogens sind voneinander abgrenzbar.

Bei annähernd 60% aller Eizylinder waren die Eihüllen am Tag 11,3 bereits kollabiert, bei den restlichen geschah dies im Laufe der nächsten Stunden.

Eine Dottersackzirkulation war bei knapp 10% der Embryonen noch nachweisbar.

Auch bei den Embryonen mit zusammengefallenen Eihüllen war in der Regel ein Herzschlag feststellbar.

Die über 24 Stunden in einem Medium mit 100µg Thallium/ml gewachsenen Embryonen machten makroskopisch einen so schwer geschädigten Eindruck, daß auf eine histologische Untersuchung der Embryonen verzichtet werden konnte.

Die DNA-Zunahme der unter Einfluß von 100µg Thallium/ml Medium gewachsenen Eizylinder lag bei 35% im Vergleich zu den Kontrollen (100%).

An Protein bildeten die Eizylinder in den ersten 24 Stunden Kultur 45% weniger als die Kontrollen im gleichen Zeitraum.

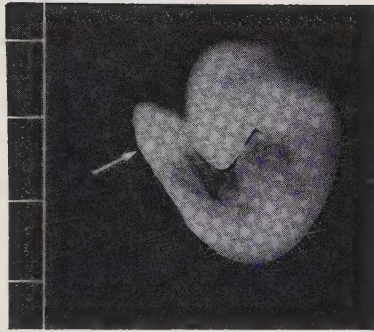
Entsprechend der verminderten Protein- und DNA-Synthese verbrauchten die Embryonen nur die Hälfte an Glukose im Vergleich zu den Kontrollen.

Auch die Lactatproduktion war gegenüber den Kontrollen um knapp 50% vermindert.

Im Vergleich zu den Kontrollen war der Anteil an Glukose, der zu Lactat metabolisiert wurde, leicht erhöht; er lag bei 78%.

30µg Thallium/ml Medium;
nach 24 Stunden Kultur

Die Kultur 10,3 Tage alter Rattenembryonen in einem Medium mit 30µg Thallium pro Milliliter Medium führte nach 24stündiger Kultur zu einer



100µg Thallium

Abbildung 5.3.2.2.

Rattenembryo nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 100µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B)

Nach 24 Stunden Kultur ist der Embryo bereits so mißgebildet, daß die Somitenzahl nicht genau bestimmbar ist; mit annähernd 16 Somiten gehört er in das Stadium D (Tag 11); der Schwanz (→) ist zu kurz ausgebildet; bei dem Embryo waren die Eihüllen bereits kollabiert.

Wachstumsretardierung. Anstelle von 23-24 Somiten hatten die Embryonen durchschnittlich 19-20 Somiten; das entspricht einem Entwicklungsrückstand von 4 Stunden (vgl. Punkt 4.2.).

Die Anlagen der ersten drei Kiemenbögen sowie Augen- und Ohranlagen waren deutlich zu erkennen. Am Herzen konnte der bulbus und der embryonale Ventrikel unterschieden werden.

Von ihrem makroskopischen Eindruck her gehörten die Embryonen in ein mittleres Stadium D.

Die Eihüllen waren turgeszent; Herzschlag und Dottersackzirkulation waren unauffällig.

Außer der Wachstumsretardierung war bei den Embryonen makroskopisch nichts Auffälliges zu bemerken.

Bei der sorgfältigen mikroskopischen Untersuchung der Embryonen bestätigte sich bis auf eine Ausnahme der makroskopische Eindruck :

Die Augenfurchen hatten sich zum Augenbläschen geschlossen, in Höhe des 9. Somiten begann sich die Anlage der vorderen Extremitäten auszubilden. Aufregende Mißbildungen waren nicht zu entdecken; auffällig war, daß in den kaudalen Bereichen des geschlossenen Neuralrohres und in den mesodermalen Strukturen der Somiten vermehrt Nekrosen zu finden waren.

Dem makroskopischen und mikroskopischen Eindruck entsprechend fiel hier der Rückstand in der DNA- und Proteinbildung geringer aus als bei den Eizylindern, die unter Einfluß von 100µg Thallium/ml Medium gewachsen waren.

Im Vergleich zu den Kontrollen bildeten die unter Einwirkung von 30µg Thallium pro Milliliter gewachsenen Embryonen anstelle von durchschnittlich 600µg Protein nur 400µg Protein und statt 18µg DNA nur 11µg DNA.

Vergleichbar mit der Protein- und DNA-Bildung sanken auch der Glukoseverbrauch und die Lactatbildung gegenüber den Kontrollen um 30-40%.

Der Anteil an Glukose, der zu Lactat umgewandelt wurde, lag bei 72 %.

10µg Thallium/ml Medium;
nach 24 Stunden Kultur

Bei der makroskopischen Untersuchung konnten weder Entwicklungsrückstände noch Mißbildungen festgestellt werden.

Mit 23-24 Somiten hatten die Embryonen einen mit den Kontrollen vergleichbaren Entwicklungsstand.

Auf der Abbildung 5.3.2.5. sind die vorderen Extremitätenknospen in Höhe des 8.-10. Somiten zu erkennen, die Anlagen der hinteren Extremitäten sind zu ahnen.

Herz und Kiemenbögen sind normal entwickelt.

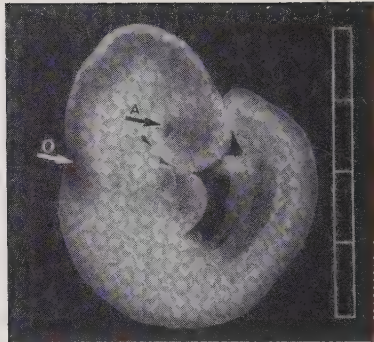
Auch die mikroskopische Untersuchung ergab keine auffälligen Befunde.

Hatte sich unter Einfluß von 30µg Thallium/ml Medium bei den Embryonen das Ohrgrübchen noch nicht zum Ohrbläschen geformt, so trafen wir hier nur auf geschlossene Ohrbläschen. Auch die Augenanlage hatte sich normal entwickelt; Augenbläschen und Linsenplakode begannen sich einzusenken.

Die Rathke'sche Tasche war bei nicht allen Embryonen nachweisbar.

Weder im kaudalen Neuralrohr noch in den mesodermalen Strukturen der Somiten konnten wir vermehrt Nekrosen finden.

Hinsichtlich Protein- und DNA-Bildung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Trotzdem ist eine Tendenz zu geringeren Protein- und DNA-Werten zu erkennen; der Glukoseverbrauch und die Lactatbildung sind mit den Kontrollen nahezu identisch.



30µg Thallium
Abbildung 5.3.2.3.

Rattenembryo nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 30µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B)

Der Embryo ist in seiner Entwicklung zurückgeblieben; mit nur 19-20 Somiten gehört er in das Stadium D (Tag 11).

Außer der Wachstumsretardierung ist bei dem Embryo makroskopisch nichts Auffälliges zu bemerken;

Augenanlage (A) und Ohranlage (O) sind zu erkennen, das Herz hat sich normal entwickelt.

3µg Thallium/ml Medium;
nach 24 Stunden Kultur

Bei der makroskopischen und mikroskopischen Untersuchung konnten wir keinen Unterschied zu den Kontrollen sehen.

Bei den Protein- und DNA- sowie Glukose- und Lactatwerten traten keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen auf.

1µg Thallium/ml Medium;
nach 24 Stunden Kultur

Wie zu erwarten, konnte weder bei der morphologischen Untersuchung noch bei der Bestimmung des Protein- und DNA-Gehaltes ein Einfluß dieser Thalliumdosis auf die in vitro-Entwicklung der Rattenembryonen festgestellt werden.

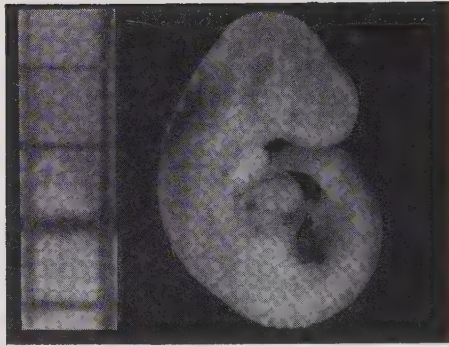
5.3.3. Ergebnisse nach 48 Stunden Kultur

100µg Thallium/ml Medium;
nach 48 Stunden Kultur

Nach 48 Stunden waren bei allen Eizylindern die Eihüllen kollabiert. Weder Herzschlag noch Dottersackzirkulation waren erkennbar; die Embryonen waren abgestorben.

Versuchte man die Embryonen aus ihren Eihüllen zu präparieren, so traf man auf einen schwammigen Zellhaufen in Form eines Embryos.

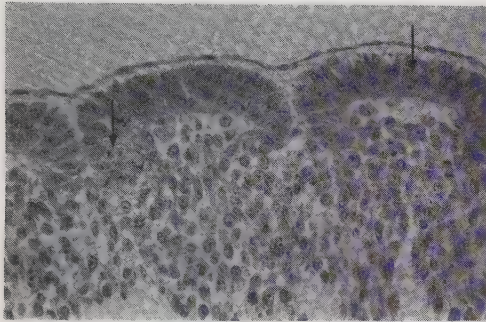
Durch Vergleich von Abbildung 5.3.3.2. und Abbildung 5.3.2.2. wird deutlich, daß die Embryonen in den letzten 24 Stunden Kultur nicht mehr gewachsen waren. Man kann vermuten, daß die Embryonen nur wenige Stunden nach Vollendung des ersten Kulturtages abgestorben waren.



10µg Thallium
Abbildung 5.3.2.5.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro;
Stadium E (25 Somiten),
nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 10µg Thallium/ml, ausgehend
von Tag 10,3 (Stadium B).

Im Vergleich zum Kontrollembrryo ist kein Unterschied in der Entwicklung
festzustellen; im Verhältnis zum Kontrollembrryo macht dieser Embryo
einen etwas dünneren Eindruck.



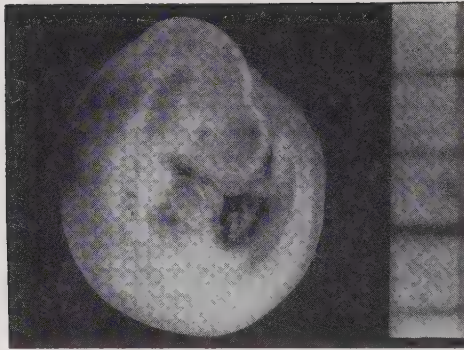
10µg Thallium
Abbildung 5.3.2.6.

Schnitt durch die Somitenanlage eines Rattenembryos nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 10µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

Der Embryo hat sich normal entwickelt (25 Somiten; Stadium E).

Weder in den Somiten noch im angrenzenden mesodermalen Gewebe sind Nekrosen nachweisbar - Normalbefund -

(→) Mitosen



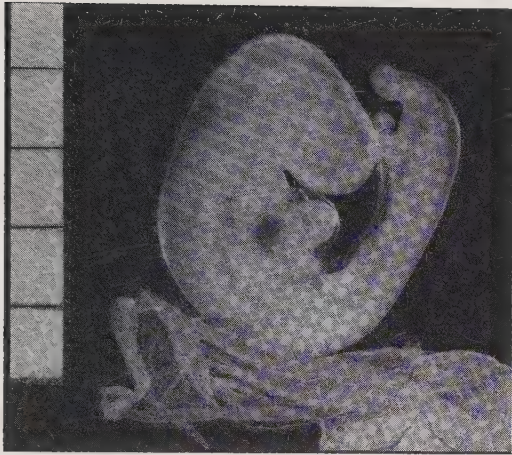
3 μ g Thallium
Abbildung 5.3.2.7.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro;

Stadium E (24 Somiten),

nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 3 μ g Thallium/ml, ausgehend
von Tag 10,3 (Stadium B).

Im Vergleich zum Kontrollembryo ist kein Unterschied in Entwicklung
und Wachstum festzustellen.



1 μ g Thallium
Abbildung 5.3.2.8.

Rattenembryo Tag 11,3 in vitro;
Stadium E (23 Somiten),
nach 24 Stunden Kultur in einem Medium mit 1 μ g Thallium/ml, ausgehend
von Tag 10,3 (Stadium B)

Im Vergleich zum Kontrollembryo ist kein Unterschied in Entwicklung
und Wachstum festzustellen.

Der makroskopische Befund der abgestorbenen Embryonen machte eine histologische Untersuchung der Embryonen überflüssig.

Bei der Bestimmung des Protein- und DNA-Gehaltes bestätigte sich der Eindruck aus der Morphologie.

Weder bei den Protein- und DNA-Werten noch beim Glukoseverbrauch und der Lactatbildung waren zwischen 1. und 2. Tag der Kultur signifikante Unterschiede feststellbar.

Die Protein- und DNA-Werte lagen nach 48stündiger Kultur zum Teil niedriger (nicht signifikant) als nach 24stündiger Kultur. Diese Differenzen sind damit zu erklären, daß die Eizylinder nach zweitägiger Kultur von so bröckeliger Konsistenz waren, daß man Schwierigkeiten hatte, das Material quantitativ für die Bestimmung zu gewinnen.

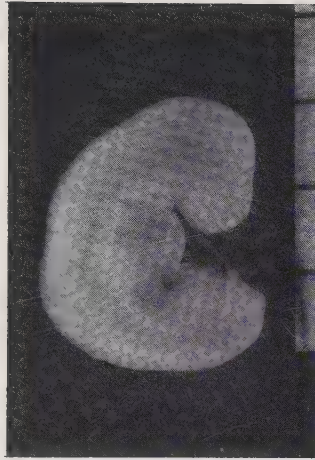
30µg Thallium/ml Medium;
nach 48 Stunden Kultur

Bereits nach 24stündiger Kultur war ein Entwicklungsrückstand von ca. 4 Stunden festzustellen; nach 48stündiger Kultur lag der Rückstand bei über 19 Stunden.

Die Embryonen hatten durchschnittlich 26 Somiten gebildet, was einer Normalentwicklung über 28-29 Stunden entspricht.

Bei allen Embryonen waren Herzschlag und Dottersackzirkulation nachweisbar, bei keinem Embryo waren die Eihüllen kollabiert. Makroskopisch waren die Embryonen bis auf den Schwanzbereich unauffällig.

In der Abbildung 5.3.3.3. erkennt man, daß der Schwanz etwas zu kurz und plump geraten ist. Unter der Lupe hatte man Schwierigkeiten, die Somiten im Schwanzbereich zu zählen, da sich hier die Somiten nicht sauber von einander getrennt hatten.



100 μ g Thallium
Abbildung 5.3.3.2.

Rattenembryo nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 100 μ g Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

Der Embryo war nach 48 Stunden Kultur abgestorben, die Eihüllen waren kollabiert.

Von der Größe her entspricht er einem Rattenembryo nach 12-14 Stunden Kultur.

Während die makroskopische Untersuchung keine aufregenden Befunde lieferte, überraschte das histologische Bild : Bis auf die Herzanlage, die äußere Umhüllung des Embryos und die chorda dorsalis zeigten alle Organanlagen schwere Schäden.

Im gesamten ZNS war die Mehrzahl aller Neuroepitelzellen nekrotisch.

Besonders betroffen waren die dorsalen Bereiche der Anlagen von Gehirn und Rückenmark.

Eindrucksvoll sind die Bilder 5.3.3.4. und 5.3.3.5., auf denen im Querschnitt ein kaudaler Abschnitt der Rückenmarksanlage zu sehen ist. Die Rückenmarksanlage als solche ist nur schwer zu erkennen, da das von Epithelzellen begrenzte Ventrikellumen mit nekrotischem Zellmaterial ausgefüllt ist.

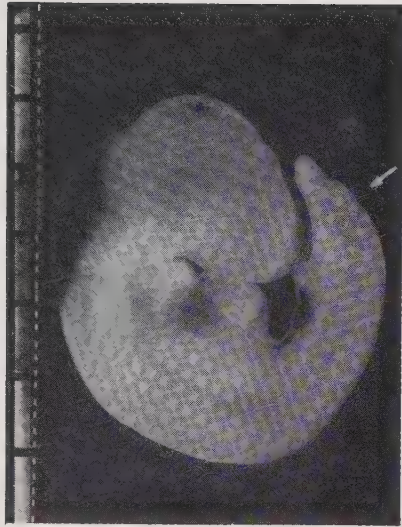
Bei der histologischen Untersuchung der Kiemenbogenanlagen, des paraxialen Mesoderms, der Somiten sowie der Anlagen der vorderen Extremitäten fanden wir ebenfalls zahlreiche nekrotische Bezirke.

Das Entoderm war verhältnismäßig wenig zerstört, allein im Gebiet der Schilddrüsenanlage und des weiter kaudal gelegenen Laryngotrachealkanals waren vereinzelt Zellnekrosen nachweisbar.

30µg Thallium/ml Medium führten bei 48stündiger Kultur nicht nur zu einem Entwicklungsrückstand, sondern auch zu einem Wachstumsrückstand der Eizylinder.

Der Proteingehalt der nackten Embryonen lag bei 50% des Proteingehaltes der Kontrollembryonen (100%); die Embryonen ohne Thallium im Medium bildeten während der letzten 24 Stunden Kultur doppelt soviel DNA wie die mit 30µg Thallium/ml Medium behandelten Embryonen.

Auch der Glukoseverbrauch lag um 40% niedriger als bei den Kontrollen; verglichen mit den Kontrollen (100%) befand sich die Lactatbildung bei gut 65%. Mit einem Anteil von 44% des Glukoseverbrauchs, der zu Lactat metabolisiert wurde, war die Lactatbildung im Verhältnis leicht erhöht.

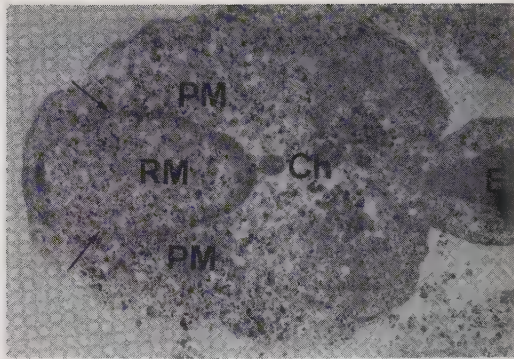


30µg Thallium
Abbildung 5.3.3.3.

Rattenembryo nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 30µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

Der Rattenembryo ist in der Entwicklung zurückgeblieben und hat nur 26 Somiten gebildet (Stadium E).

Bis auf den zu kurzen Schwanz (→) ist makroskopisch nichts Auffälliges zu erkennen.



30µg Thallium
Abbildung 5.3.3.4.

Querschnitt durch einen Rattenembryo am Tag 12,3 nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 30µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

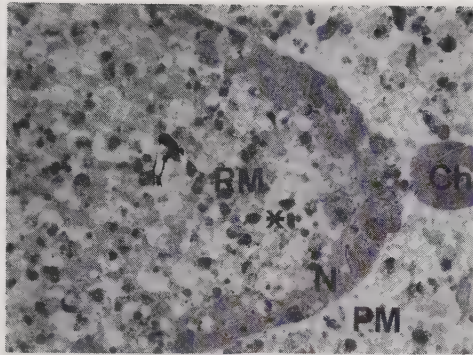
Der Embryo hat mit 26 Somiten das Stadium E erreicht.

Der ganze Querschnitt ist übersät mit Zellnekrosen; das Neuroepithel (→) im dorsalen Bereich der Rückenmarksanlage ist in seiner Struktur aufgelöst; das Ventrikellumen (*) ist ausgefüllt mit nekrotischem Material.

(PM) = paraaxiales Mesoderm

(Ch) = Chorda

(E) = Entoderm



30µg Thallium
Abbildung 5.3.3.5.

Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 5.3.3.4.

Querschnitt durch die Rückenmarksanlage eines Rattenembryos am Tag 12,3 nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 30µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

Der Embryo hat mit 26 Somiten das Stadium E erreicht.

Bis auf 1-2 Zellanlagen ist das Neuroepithel (N) der Rückenmarksanlage (RM) zerstört;

auch das angrenzende paraaxiale Mesoderm (PM) zeigt massenhaft Nekrosen; das Ventikellumen (*) der Rückenmarksanlage (RM) ist mit nekrotischem Material ausgefüllt;

unberührt ist die Chorda (Ch) geblieben.

10µg Thallium/ml Medium;
nach 48 Stunden Kultur

Makroskopisch waren die Embryonen völlig unauffällig. Hinsichtlich Somitenzahlen und Differenzierungsgrad war zwischen den Kontrollen und den mit 10µg Thallium pro Milliliter Medium behandelten Embryonen kein Unterschied erkennbar.

Allein bei der Größe waren leichte Differenzen feststellbar, wobei die Unterschiede weniger in der Länge als vielmehr in der Dicke der Embryonen lagen.

Herzschlag und Dottersackzirkulation waren normal ausgeprägt; vordere und hintere Extremitäten waren deutlich erkennbar. Die Anlagen des ersten Kiemenbogens begannen zu verschmelzen.

Bei der histologischen Untersuchung konnte der makroskopisch erhobene Befund nicht bestätigt werden : Vor allem das Neuroepithel von Gehirnanlage und Rückenmark war schwer geschädigt; besonders zahlreich waren die Nekrosen in den dorsalen Bereichen des ZNS.

War unter Einfluß von 30µg Thallium pro Milliliter Medium das Neuroepithel in seiner ganzen Breite zerstört, so beschränkten sich jetzt die Nekrosen auf die mittleren Bereiche des Epithels; bei Epithelzellen, die am Rand zum Ventrikellumen und zum paraaxialen Mesoderm lagen, konnten nur sehr vereinzelt Nekrosen nachgewiesen werden.

Im paraaxialen Mesoderm und in den Kiemenbogenanlagen waren nur sehr wenige Nekrosen zu sehen; demgegenüber konnten wir im Bereich der Somiten und der limb-Anlagen vermehrt Zellnekrosen feststellen.

Bereits bei der makroskopischen Begutachtung der Embryonen war der Verdacht aufgekommen, daß die Embryonen im Verhältnis zu den Kontrollen etwas zu dünn waren.

Protein- und DNA-Bestimmung bestätigten diese Vermutung : Anstelle von guten 600µg Protein (Kontrollen) wurden beim Embryo ohne Hüllen (10µg

Thallium/ml Medium) nur 500µg Protein gemessen. Der Eizylinder (10µg Thallium/ml Medium) hatte im Vergleich zu den Kontrollen (100%) nur 75% an DNA und 60% an Protein gebildet.

Beim Glukoseverbrauch und der Lactatbildung waren im Verhältnis zu den Kontrollen keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

3µg Thallium/ml Medium;
nach 48 Stunden Kultur

Makroskopisch war hinsichtlich Wachstum und Differenzierung zwischen behandelten Embryonen und Kontrollen kein Unterschied feststellbar.

Dieses Urteil konnte bei der mikroskopischen Betrachtung der Embryonen nicht voll bestätigt werden : Während Mesoderm und Entoderm unauffällig waren, konnten im Neuroepithel des ZNS Nekrosen nachgewiesen werden. Wiederum waren es die dorsalen Bereiche des ZNS, die bevorzugt geschädigt waren.

Wie aus Abbildung 5.3.3.11. ersichtlich ist, war das Ausmaß der Schädigung viel geringer als bei den höheren Thalliumdosen. Bei der genauen Betrachtung des Neuroepithels fielen vermehrt Interzellularspalten und Makrophagen auf.

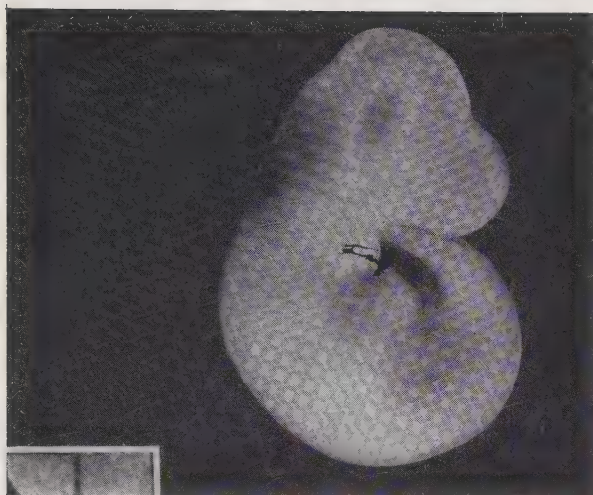
Dieser Befund läßt die Vermutung zu, daß ein Teil der durch Thallium verursachten Zellnekrosen während der in vitro-Entwicklung durch phagocytierende Makrophagen beseitigt worden war.

Der Glukose- und Lactatstoffwechsel der Eizylinder (3µg Thallium/ml Medium) zeigte zu dem der Kontrollen keinen Unterschied.

1µg Thallium/ml Medium;

nach 48 Stunden Kultur

War nach 24stündiger Kultur kein Effekt mit unseren Mitteln feststellbar, so konnten wir auch nach zweitägiger Kultur keinen Einfluß dieser Thalliumdosis im Medium auf die in vitro-Entwicklung der Embryonen erkennen.

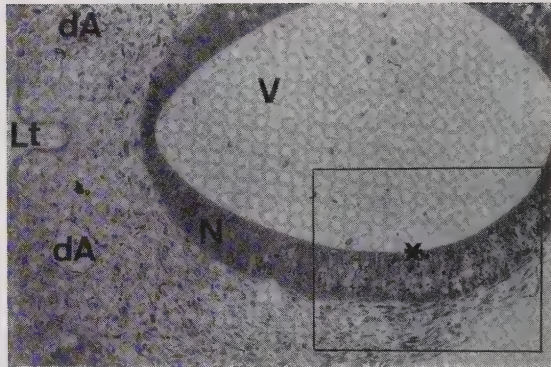


10µg Thallium
Abbildung 5.3.3.6.

Rattenembryo Tag 12,3 in vitro;
Stadium F (31 Somiten),
nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 10µg Thallium/ml, ausgehend
von Tag 10,3 (Stadium B).

Im Vergleich zum Kontrollembryo ist kein Unterschied in der Entwicklung
festzustellen.

Im Verhältnis zum Kontrollembryo ist ein deutlicher Rückstand in der
Dicke des Embryos zu sehen.



10 μ g Thallium
Abbildung 5.3.3.7.

Querschnitt durch einen Rattenembryo in Höhe des beginnenden Laryngotrachealkanals (Lt).

Rattenembryo Tag 12,3 in vitro;

Stadium F (31 Somiten),

nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 10 μ g Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

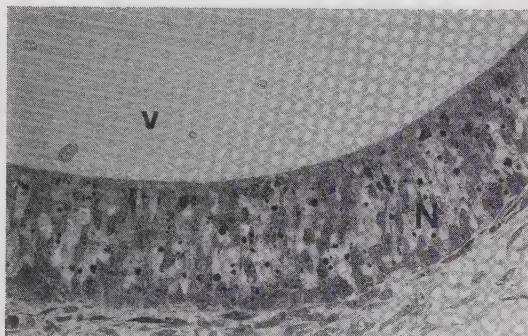
Die Struktur der erkennbaren Organe ist erhalten geblieben.

(N) = Neuroepithel

(V) = Ventrikel

(dA) = dorsale Aorta

(*) = Ausschnitt für Abbildung 5.3.3.8.



10µg Thallium
Abbildung 5.3.3.8.

Ausschnitt aus Abbildung 5.3.3.7.

Dargestellt ist ein dorsaler Bereich der Rückenmarksanlage.

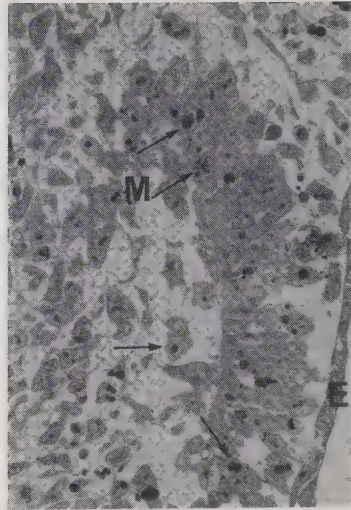
Rattenembryo Tag 12,3 in vitro;

Stadium F (31 Somiten),

nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 10µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium B).

Im mittleren Bereich des Neuroepithels (N) sind zahllose Zellnekrosen zu sehen;

die an Ventrikel (V) und Mesoderm grenzenden Epithelzellen zeigen weniger Nekrosen.



10µg Thallium
Abbildung 5.3.3.9.

Schnitt durch den Somiten eines Rattenembryos Tag 12,3 in vitro;
 Stadium F (31 Somiten),
 nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 10µg Thallium/ml, ausgehend
 von Tag 10,3 (Stadium B).

Im Bereich des Somiten (Mesoderm) sind zahlreiche Zellnekrosen (→) zu erkennen.

(M) = Mitose

(E) = Epidermis



3 μ g Thallium
Abbildung 5.3.3.10.

Rattenembryo Tag 12,3 in vitro;
Stadium F (31 Somiten),
nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 3 μ g Thallium/ml, ausgehend
von Tag 10,3 (Stadium B).

Im Vergleich zum Kontrollembryo ist kein Unterschied in der Entwicklung
festzustellen.



3µg Thallium
Abbildung 5.3.3.11.

Querschnitt durch die Rückenmarksanlage eines Rattenembryos Tag 12,3 in vitro;
 Stadium B (31 Somiten),
 nach 48 Stunden Kultur in einem Medium mit 3µg Thallium/ml, ausgehend von Tag 10,3 (Stadium F).

Im Bereich des Neuroepithels (N) sind Zellnekrosen (→) nachweisbar.

(V) = Ventrikel.

Tag	Kontrolle	1µg Tl/ml	3µg Tl/ml	10µg Tl/ml	30µg Tl/ml	100µg Tl/ml
10,3						
Embryo						
Somiten	8,8±1,4(26)	8,9±1,6(18)	8,9±1,5(18)	8,7±1,6(18)	8,7±1,3(17)	8,9±1,8(19)
Embryo+Hüllen						
Protein(µg)**	185±8,7(7)*					
DNA(µg)**	16,8±1,9(7)*					
Medium						
Glucoseconc.(mg%)	364±6 (10)	368±5 (10)	361±6 (10)	365±9 (9)	361±4 (10)	362±6 (10)
Lactatconc.(mg%)	10,0±0,9(10)	10,1±1,2(8)	10,2±1,4(10)	9,9±0,8(10)	10,4±1,0(10)	10,0±1,0(10)
11,3(nach 24h Kultur)						
Embryo						
Somiten	23,5±1,0(11)	23,6±0,6(9)	23,5±0,6(8)	23,4±0,9(9)	19,7±0,8(9)	nicht zählbar
Protein(µg)	253±28 (5)	251±28 (5)	241±26 (4)	223±30 (6)	175±24 (6)	133±28 (6)
DNA(µg)	24,8±1,9(3)	23,5±2,1(3)	25,6±2,0(4)	24,0±2,7(5)	19,6±1,9(5)	15,3±1,4(5)
Hüllen						
Protein(µg)	543±51 (5)	546±47 (5)	518±46 (4)	504±48 (6)	426±43 (6)	395±41 (6)
DNA(µg)	9,9±0,8(5)	10,5±0,6(3)	10,0±1,1(4)	10,0±0,8(5)	8,3±1,5(5)	8,8±1,5(5)
Medium						
Glucoseconc.(mg%)	293±6 (9)	300±8 (9)	294±7 (9)	296±8 (9)	316±6 (9)	324±11 (9)
Lactatconc.(mg%)	62,2±2,0(8)	61,6±1,6(8)	61,3±1,6(6)	62,9±1,9(9)	42,0±0,9(7)	39,0±1,3(5)
12,3(nach 48h Kultur)						
Embryo						
Somiten	31,5±0,3(15)	31,2±0,5(7)	31,3±0,3 (9)	31,1±0,6 (8)	26,0±1,3 (8)	nicht zählbar
Protein(µg)	610±63 (9)	654±71 (5)	640±62 (10)	489±44 (7)	303±31 (7)	125±21 (9)
DNA(µg)	47,1±6,7(6)	46,3±6,3(3)	45,9±5,8 (5)	39,4±2,8 (5)	30,1±3,1 (6)	14,8±1,9(5)
Hüllen						
Protein(µg)	829±67 (8)	797±73 (4)	830±77 (6)	682±63 (8)	527±41 (6)	406±53 (6)
DNA(µg)	19,1±4,1(5)	18,4±4,1(3)	19,3±4,0 (5)	17,8±2,2 (6)	14,5±2,0 (6)	8,0±2,7 (4)
Medium						
Glucoseconc.(mg%)	248±10 (10)	251±9 (9)	253±13 (9)	260±10 (7)	290±11 (7)	326±13 (6)
Lactatconc.(mg%)	80,1±3,8(8)	79,7±4,0(8)	81,2±4,2 (6)	78,9±4,1 (8)	54,0±3,9 (7)	39,9±3,1(7)

Tabelle 5.3.3.1.

Vergleich der Kulturergebnisse von Rattenembryonen (Tag 10,3), die 24 Stunden (Tag 11,3) bzw. 48 Stunden (Tag 12,3) in einem Kulturmedium mit 1µg, 3µg, 10µg, 30µg und 100µg Thallium pro ml Medium gewachsen sind, mit den Kulturergebnissen entsprechender Kontrollen.

* Die Werte sind aus der Tabelle 4.3.1. übernommen.

**Bei den Eizylindern des Tages 10,3 war eine ausreichend genaue Trennung in Embryo und Hülle nicht möglich.

1. TAG DER KULTUR	Somiten-zunahme	Protein-zunahme ($\mu\text{g}/\text{Eizylinder}$)	DNA-Zunahme ($\mu\text{g}/\text{Eizylinder}$)	Glukose-verbrauch ($\text{mg}/\text{Eizylinder}$)	Lactat-bildung ($\text{mg}/\text{Eizylinder}$)
Kontrollen	$14,7 \pm 0,4$	611 ± 70	$17,9 \pm 0,8$	$1,84 \pm 0,12$	$1,33 \pm 0,05$
$1 \mu\text{g Tl}/\text{ml}$	$14,7 \pm 1,0$	612 ± 67	$17,2 \pm 0,8$	$1,70 \pm 0,3$	$1,34 \pm 0,08$
$3 \mu\text{g Tl}/\text{ml}$	$14,6 \pm 0,9$	574 ± 64	$18,8 \pm 1,2$	$1,74 \pm 0,11$	$1,36 \pm 0,08$
$10 \mu\text{g Tl}/\text{ml}$	$14,7 \pm 0,7$	542 ± 70	$17,6 \pm 1,2$	$1,79 \pm 0,12$	$1,37 \pm 0,03$
$30 \mu\text{g Tl}/\text{ml}$	$11,0 \pm 0,5$	416 ± 59	$11,2 \pm 0,4$	$1,16 \pm 0,08$	$0,84 \pm 0,03$
$100 \mu\text{g Tl}/\text{ml}$	-	343 ± 61	$6,4 \pm 1,0$	$0,99 \pm 0,13$	$0,78 \pm 0,03$

Tabelle 5.3.3.2.

Einfluß von Thallium auf die Somiten-, Protein- und DNA-Zunahme, den Glukoseverbrauch und die Lactatbildung von Rattenembryonen während 24stündiger Kultur von Tag 10,3 auf Tag 11,3 (1. Tag der Kultur).
 10,3 Tage alte Rattenembryonen wurden für 48 Stunden in einem Kulturmedium mit $1 \mu\text{g}$, $3 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$ und $100 \mu\text{g}$ Thallium pro Milliliter Medium kultiviert.

2. TAG DER KULTUR	Somitenszunahme	Proteinzunahme ($\mu\text{g}/\text{Eizylinder}$)	DNAzunahme ($\mu\text{g}/\text{Eizylinder}$)	Glukoseverbrauch ($\text{mg}/\text{Eizylinder}$)	Lactatbildung ($\text{mg}/\text{Eizylinder}$)
Kontrollen	$8,0 \pm 0,7$	633 ± 51	$31,5 \pm 7,1$	$1,16 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,06$
$1 \mu\text{g TI}/\text{ml}$	$7,6 \pm 0,1$	654 ± 31	$30,7 \pm 7,7$	$1,24 \pm 0,1$	$0,47 \pm 0,07$
$3 \mu\text{g TI}/\text{ml}$	$7,8 \pm 0,3$	711 ± 67	$29,6 \pm 6,7$	$1,06 \pm 0,15$	$0,46 \pm 0,05$
$10 \mu\text{g TI}/\text{ml}$	$7,7 \pm 0,3$	444 ± 28	$22,8 \pm 6,7$	$0,96 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,05$
$30 \mu\text{g TI}/\text{ml}$	$6,3 \pm 0,5$	219 ± 5	$16,8 \pm 1,8$	$0,69 \pm 0,13$	$0,31 \pm 0,06$
$100 \mu\text{g TI}/\text{ml}$	- -	- -	- -	- -	- -

Tabelle 5.3.3.3.

Einfluß von Thallium auf die Somiten-, Protein- und DNA-Zunahme, den Glukoseverbrauch und die Lactatbildung von Rattenembryonen während 24stündiger Kultur von Tag 11,3 auf Tag 12,3 (2. Tag der Kultur).
10,3 Tage alte Rattenembryonen wurden für 48 Stunden in einem Kulturmedium mit $1 \mu\text{g}$, $10 \mu\text{g}$, $30 \mu\text{g}$ und $100 \mu\text{g}$ Thallium pro Milliliter Medium kultiviert.

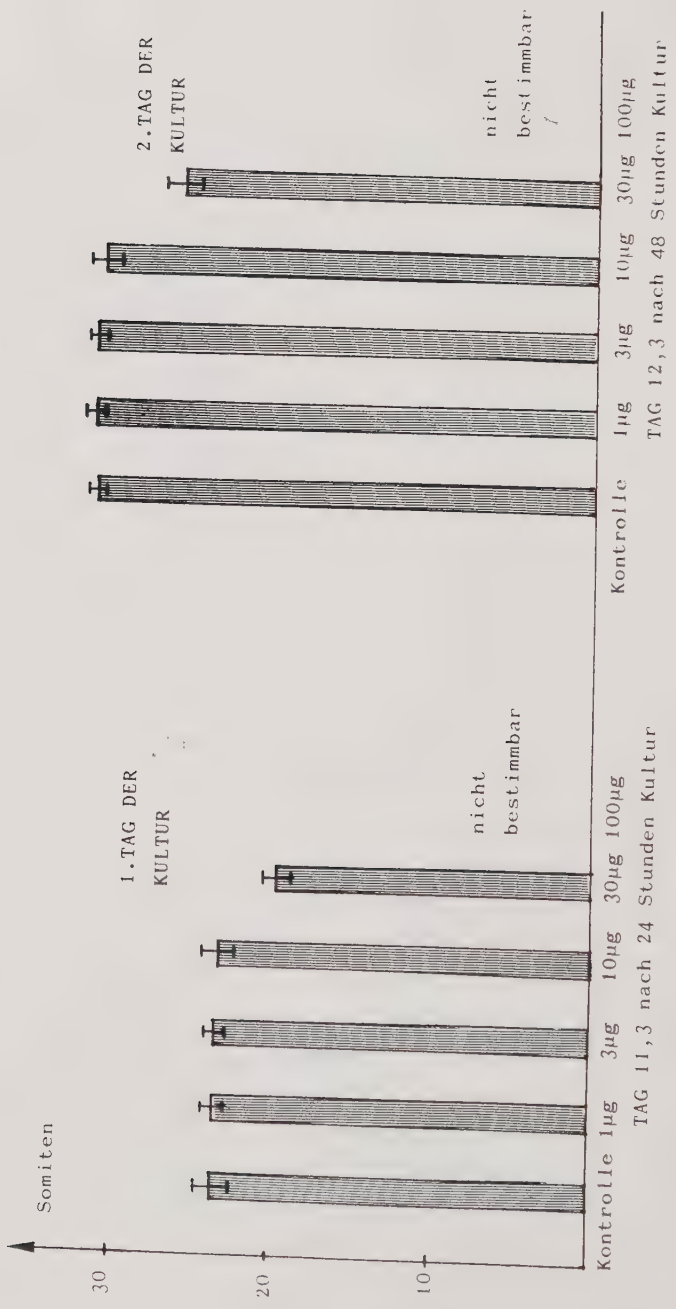


Abbildung 5.3.3.15.

Vergleich der Somitenzahl von Rattenembryonen (Tag 10,3), die 24 Stunden bis Tag 11,3 (entspricht 1. Tag der Kultur) und 48 Stunden bis Tag 12,3 (entspricht 2. Tag der Kultur) in einem Kulturmedium mit 1µg, 3µg, 10µg, 30µg und 100µg Thallium pro Milliliter Medium gewachsen sind, mit der Somitenzahl entsprechender Kontrollen.

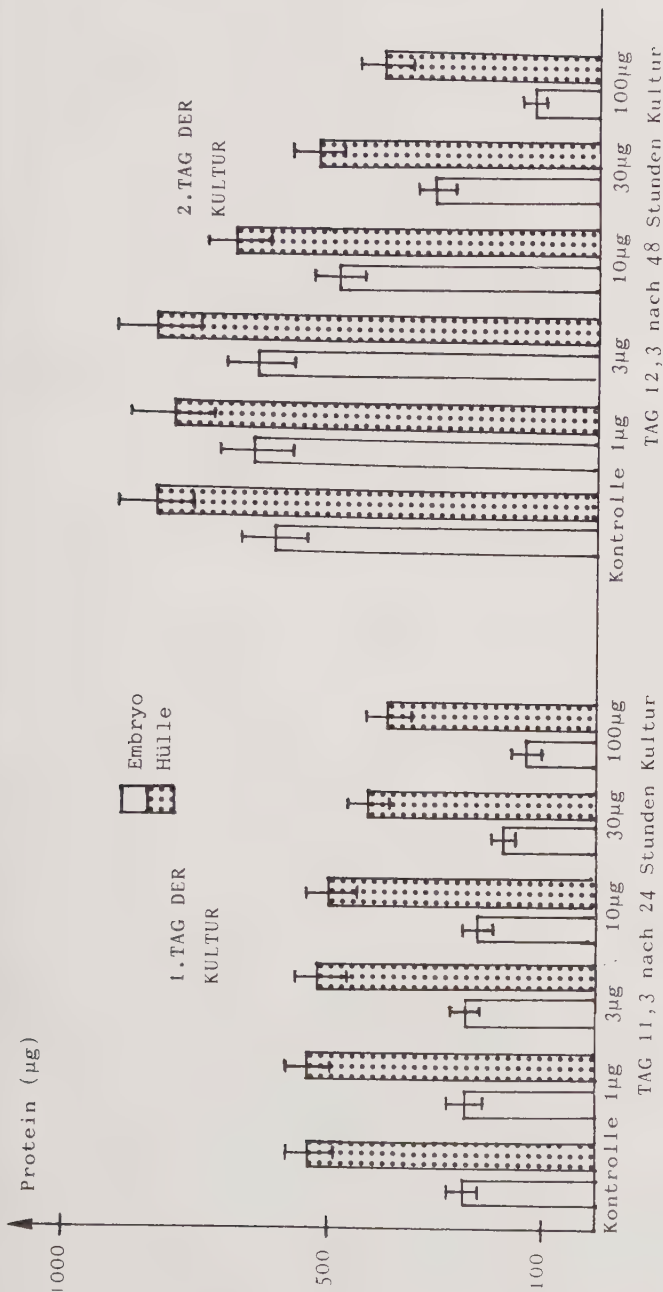


Abbildung 5.3.3.16.

Vergleich des Proteingehaltes von Rattenembryonen (Tag 10,3) und deren Eihüllen, die 24 Stunden bis Tag 11,3 (entspricht 1. Tag der Kultur) und 48 Stunden bis Tag 12,3 (entspricht 2. Tag der Kultur) in einem Kulturmedium mit 1 µg, 3 µg, 10 µg, 30 µg und 100 µg Thallium pro Milliliter Medium gewachsen sind, mit dem Proteingehalt entsprechender Kontrollen.

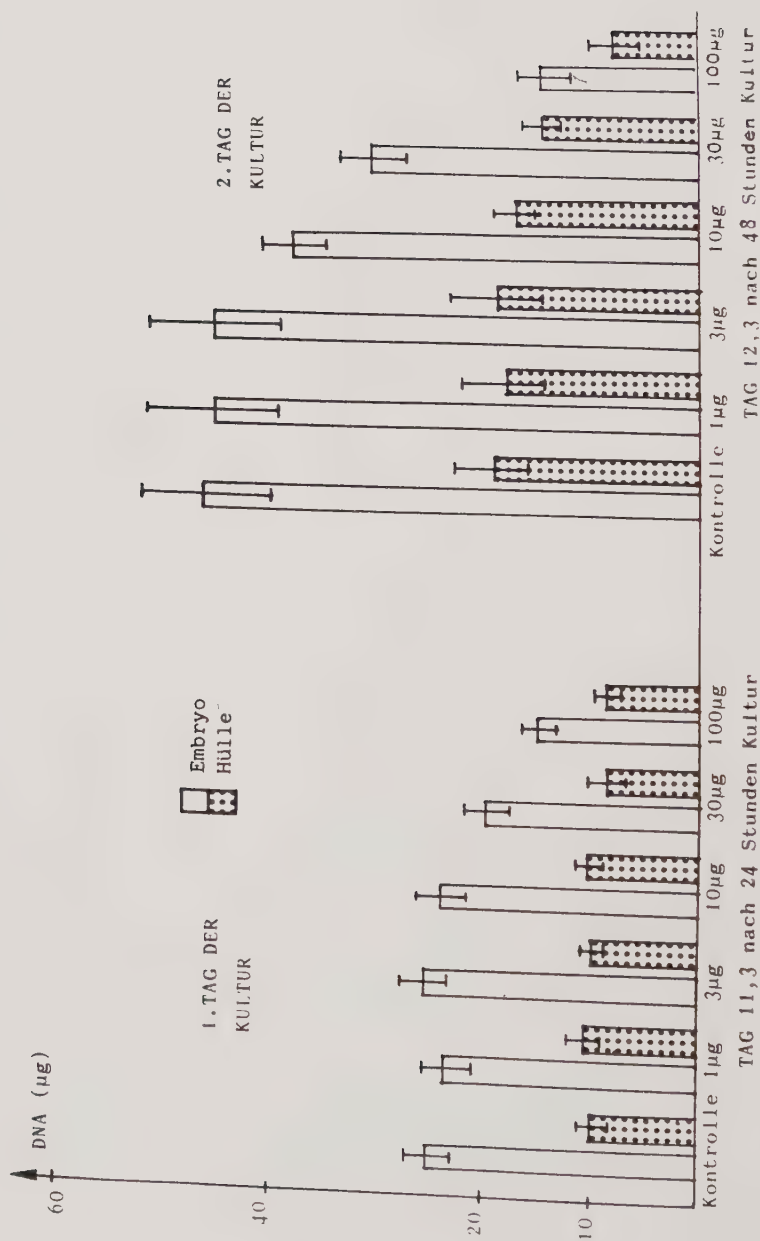


Abbildung 5.3.3.17.

Vergleich des DNA-Gehaltes von Rattenembryonen (Tag 10,3) und deren Eihüllen, die 24 Stunden bis Tag 11,3 (entspricht 1. Tag der Kultur) und 48 Stunden bis Tag 12,3 (entspricht 2. Tag der Kultur) in einem Kulturmedium mit 1µg, 3µg, 10µg, 30µg und 100µg Thallium pro Milliliter Medium gewachsen sind, mit dem DNA-Gehalt entsprechender Kontrollen.

5.4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Es konnte gezeigt werden, daß Thallium in der Lage ist, die in vitro-Entwicklung von Rattenembryonen zu stören. Mit steigender Thalliumkonzentration im Medium und steigender Kulturdauer nahmen die erkennbaren embryotoxischen Effekte zu.

100µg Thallium pro Milliliter Medium verursachten bei den Rattenembryonen in den ersten 24 Stunden Kultur eine Wachstumsretardierung und Fehlentwicklung.

Während der weiteren in vitro-Kultur starben die Embryonen ab.

Mit 30µg Thallium pro Milliliter Medium erhielt man bei der whole embryo culture von Rattenembryonen sehr differenziert zu betrachtende Ergebnisse :

Nach 24 Stunden Kultur war außer eines geringen Entwicklungsrückstandes nichts Auffälliges zu beobachten.

Die wenigen mikroskopisch sichtbaren Nekrosen dürfen nicht überbewertet werden.

Nach 48 Stunden Kultur sahen die Verhältnisse ganz anders aus :

Makroskopisch machten die Embryonen bei Berücksichtigung ihres Entwicklungsrückstandes einen hinreichenden bis ausreichenden Eindruck. Auf keinen Fall sah man ihnen die schwere Schädigung an, die sich bei der histologischen Untersuchung herausstellte.

Während das Entoderm nur wenig Schaden genommen hatte, waren Organanlagen des Mesoderms und insbesondere die Neuralanlagen aus dem Ektoderm schwer beschädigt.

Einige Bereiche des ZNS waren regelrecht zerstört.

Bei 10µg Thallium pro Milliliter Medium war auch nach 48 Stunden Kultur makroskopisch keine Störung der Entwicklung festzustellen.

Hier half alleine die Mikroskopie weiter :

Wieder war es das Neuroepithel des ZNS, das vom Thallium bevorzugt angegriffen wurde.

Die beobachteten embryotoxischen Effekte, die durch 3µg Thallium pro Milliliter Medium nach 48 Stunden Kultur hervorgerufen wurden, waren sehr diskret. Allein das empfindliche Neuroepithel zeigte vereinzelte Zellnekrosen. Es waren Makrophagen nachweisbar, die bereits einen Teil der Nekrosen weggeräumt hatten.

Die Protein- und DNA-Werte bestätigten im allgemeinen die morphologischen Befunde. Sichtbarer Entwicklungsrückstand und gemessener Wachs-tumsrückstand waren miteinander vergleichbar.

Die wenigen DNA- und Proteinwerte erlaubten keine Differenzierung zwischen der Wirkung von Thallium auf die DNA-Bildung und der Wirkung von Thallium auf die Proteinsynthese der Eizylinder. Beide Parameter wurden als Indikatoren für das Wachstum der Embryonen betrachtet.

Unter Einfluß von Thallium sanken Glukoseverbrauch und Lactatbildung proportional zur Wachstumshemmung. Der Glukosemetabolismus änderte sich unter Einwirkung von Thallium nicht qualitativ; der Anteil an Glukose, der zu Lactat metabolisiert wurde, entsprach - mit einigen Schwankungen - den Kontrollwerten.

Als Ergebnis kann festgehalten werden, daß Thalliumkonzentrationen ab 3µg pro ml, die den Eizylinder erreichen, eine embryotoxische Wirkung auf die Entwicklung des Embryos ausüben.

Bei der Untersuchung der Wirkung von Thallium auf die in vitro-Entwicklung der limb-Anlagen der Maus konnten bei vergleichbaren Thalliumkonzentrationen im Medium Effekte beobachtet werden (persönliche Mitteilung von NEUBERT und BLUTH, 1983).

Die Frage, ob diese Ergebnisse auf in vivo-Verhältnisse übertragbar sind, muß äußerst zurückhaltend beantwortet werden. GIBSON and BECKER (1970) beschreiben einen sehr eingeschränkten Placentatransfer von Thallium bei der Ratte. Am Tag 20 liegen die mütterlichen Thalliumkonzentrationen um 15-30 mal höher als die im Fetus gemessenen Thalliumwerte.

Es ist äußerst fraglich, ob unter in vivo-Bedingungen embryotoxische Konzentrationen jenseits der Placentarschranke zu erreichen sind, ohne das Muttertier schwer zu schädigen oder letal zu vergiften.

Beim Wirkungsmechanismus des Thalliums werden zwei Angriffspunkte diskutiert :

Thallium ist ein Schwermetall und kann als allgemeines Zellgift mit SH-Gruppen von Enzymen reagieren.

Dieser Wirkungsmechanismus läßt sich sowohl unter in vitro-Bedingungen (FORTH et al., 1977) wie unter in vivo-Bedingungen am Keratin (FLESCHE, 1963) nachweisen.

Für unsere Belange wichtiger ist die Tatsache, daß Thallium und Kalium aufgrund ähnlicher Ionenradien (Kalium : 1,33 Å; Thallium : 1,44 Å) an der Zellmembran miteinander konkurrieren.

GEHRING and HAMMOND (1967) konnten nachweisen, daß die LD₅₀ von Thallium bei der Ratte durch Steigerung der Kaliumaufnahme zunimmt.

Zu untersuchen wäre, ob durch eine Verringerung der Kaliumaufnahme die Toxizität von Thallium gesteigert werden kann.

Auf unser in vitro-Modell bezogen hieße dies :

Ist es möglich, durch eine Senkung der Kaliumkonzentration im Medium die Empfindlichkeit der in vitro wachsenden Rattenembryonen gegenüber Thallium zu erhöhen.

Diese Untersuchungen stehen noch aus.

6.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Rattenembryonen am Tag 10,3 mit durchschnittlich 9 Somiten ließen sich im rotierenden Behältnis über 24 Stunden und 48 Stunden anzüchten.
2. Als Kulturmedium wurde eine Mischung aus 6 Teilen Humanserum und 2 Teilen Tyrode Phosphat-Puffer verwandt.
3. Nach 24 Stunden Kultur erreichten die Embryonen einen mit in vivo-Verhältnissen vergleichbaren Wachstums- und Entwicklungsstand.
Nach 48 Stunden blieben die in vitro-Embryonen in ihrer Entwicklung um ca. 6-8 Stunden gegenüber den in vivo-Embryonen zurück.
4. Knapp 70% der in die Kultur gegebenen Embryonen erreichten eine in vitro-Entwicklung, die Tag 11,3 in vivo entspricht.
Nach 48 Stunden Kultur waren es 35% der Embryonen, die das 31-Somitenstadium erreichten. Das 31-Somitenstadium entspricht annähernd Tag 12 in vivo.
5. Unterschiede zwischen 1. und 2. Tag der Kultur konnten beim Stoffwechsel der in vitro-Embryonen festgestellt werden :
Bezieht man den Glukoseverbrauch auf die Proteinzunahme, so sinkt der Glukoseverbrauch der Embryonen während der Kultur von Tag 11,3 auf Tag 12,3 auf 40% des Vortages; die Lactatbildung fällt am 2. Tag der Kultur um 75% gegenüber dem 1. Tag der Kultur ab.
6. Bei der Untersuchung der Wachstumskinetik zeigte sich, daß alle Embryonen nach 20 Stunden Kultur unabhängig von ihrer sehr unterschiedlichen Somitenzahl bei Kulturbeginn das 18- bis 20-Somitenstadium erreicht hatten und danach gleichmäßig weiterwuchsen.

7. Während der 48stündigen Kulturdauer von Tag 10,3 auf Tag 12,3 kommt es bei den Embryonen zur Anlage und Differenzierung vieler Organe :
Insbesondere die Herzentwicklung, die Augen- und Ohrentwicklung sowie die Anlage der Extremitätenknospen wurden untersucht und beschrieben.
8. Das Schwermetall Thallium ist in der Lage, die in vitro-Entwicklung von Rattenembryonen zu stören.
Bereits 3 μ g Thallium/ml Medium führten nach 48 Stunden Kultur zu einer deutlichen, mikroskopisch sichtbaren Nekrosenbildung im Neuroepithel.
Eine Steigerung der Thalliumkonzentration um den Faktor 10 auf 30 μ g Thallium/ml Medium hatte eine massive Nekrosenbildung in den Organanlagen des Mesoderms und Ektoderms zur Folge. Kaudale Bereiche der Rückenmarksanlage waren regelrecht zerstört.
Makroskopisch waren die in 30 μ g Thallium/ml Medium gewachsenen Embryonen - bis auf einen Wachstums- und Entwicklungsrückstand - unauffällig.

LITERATURVERZEICHNIS

- Achenbach, C., Hauswirth, O., Heindrichs, C., Ziskoven, R., Köhler, F., Smend, J., Kowalewski, D., 1979a;
Toxizität und Teratogenität von Thallium, Dtsch. Ärzteblatt, 3189 - 3192.
- Achenbach, C., Ziskoven, R., Köhler, F., Bahr, U., Schulten, H.-R., 1979b;
Quantitative Spurenanalyse von Thallium in biologischem Material, Angew. Chem., 944 - 945.
- Austin, C.R., 1973;
Embryo transfer and sensitivity to teratogenesis, Nature, 244, 333 - 334.
- Beck, F., Lloyd, J.B., 1968;
Methods for the study of embryotrophic nutrition, Lab. Anim., 2, 157.
- Beck, F., 1981;
The differentiation between teratogenic action on mother, fetal membranes and embryos using the whole embryo culture method, in : Culture Techniques (Neubert, D., Merker, H.-J., eds.) pp. 37 - 41, W. de Gruyter, Berlin - New York.
- Berry, C.L., 1968;
Comparison of in-vivo and in-vitro Growth of the rat foetus, Nature, 219, 92 - 93.
- Blankenburg, G., Bluth, U., Neubert, D., 1981;
On the significance of ascorbate and of cystein on differentiation of limb buds in organ culture, Method used in our Laboratory in Berlin, in : Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (Neubert, D., Merker, H.-J., eds.) pp. 197 - 206, 590 - 593, W. de Gruyter, Berlin - New York.
- Brown, N.A., Goulding, E.H., Fabro, S., 1979;
Ethanol embryotoxicity : Direct effects on mammalian embryos in vitro, Science, 206, 573 - 575.
- Brown, N.A., Fabro, S., 1981;
Quantitation of embryonic development in vitro : a morphological scoring system, Teratology, 24, 65 - 78.
- Burton, K., 1956;
A study of the conditions and mechanism of the diphenyl reaction for the colormetric estimation of desoxiribonucleic acid, Biochem. J., 62, 315.
- Chatot, C.L., Klein, N.W., Piatek, J., Pierro, L.J., 1980;
Successful culture of rat embryos on human serum : use in the detection of teratogens, Science, 207, 1471 - 1473.

- Christie, G.A., 1964;
Developmental stages in somite and postsomite rat embryos, based on external appearance and including some features of the macroscopic development of the oral cavity, J. Morph., 114, 263 - 286.
- Clarkson, S.G., Doering, J.V., Runner, M.N., 1969;
Growth of postimplantation mouse embryos cultures in a serum--supplemented, chemically defined medium, Teratology, 2, 181 - 186.
- Claussen, U., Roll, R., Dolguer, R., Matthiaschek, G., Majeroski, S., Stoll, B., Röhrborn, G., 1981;
Zur Mutagenität und Teratogenität von Thallium - unter besonderer Berücksichtigung der Situation in Lengerich, Rhein. - Ärztebl., 469 - 475.
- Cockroft, D.L., 1973;
Development in culture of rat fetuses explanted at 12.5 and 13.5 days of gestation, Journal of Embryology & Experimental Morphology, 29, 473 - 483.
- Cockroft, D.L., 1976;
Comparison of in vitro and in vivo Development of Rat Fetuses, Developmental Biology, 48, 163 - 172.
- Cockroft, D.L., 1977;
Post implantation embryo culture, in: Methods in Prenatal Toxicology (D. Neubert, H.-J. Merker, T.E. Kwasigroch, eds.) pp. 231 - 240, Georg Thieme Publ., Stuttgart.
- Cockroft, D.L., Coppola, P.T., 1977;
Teratogenic effects of excess glucose on head-fold rat embryos in culture, Teratology, 16, 141 - 146.
- Cockroft, D.L., New, D.A.T., 1978;
Abnormalities induced in cultures rat embryos by hyperthermia, Teratology, 17, 277 - 284.
- Comline, R.S., Silver, J., 1975;
Placental transfer of blood gases, Br. Med. Bull., 31, 25 - 31.
- Davis, L., Sadler, R.W., Langman, J., 1981;
In vitro development of the heart under influence of retinoic acid, in: Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (D. Neubert, H.-J. Merker, eds.), pp. 101 - 115, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Deuchar, E.M., 1971;
The mechanism of axial rotation in the rat embryo: an experimental study in vitro, Journal of Embryology & Experimental Morphology, 25, 189 - 201.

- Deuchar, E.M., 1975;
Reconstitutive ability of axial tissue in early rat embryos after operations and culture in vitro, Journal of Embryology & Experimental Morphology, 33, 217 - 226.
- Deuchar, E.M., 1976;
Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos, J. Embryol. Exp. Morphol., 35, 345 - 354.
- Deuchar, E.M., 1978;
Effects of streptozotocin on early rat embryos grown in culture, Experientia, 34, 84 - 85.
- Fantal, A.G., Greenaway, J.C., Juchau, M.R., Shepard, T.H., 1979;
Teratogenic bioactivation of cyclophosphamide in vitro, Life Sci., 25, 67 - 72.
- Fell, H.R., Robinson, R., 1929;
The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb buds cultivated in vitro, Biochem. J., 23, 767 - 784.
- Flesch, R., 1971;
Inhibition of keratinizing structures by systemic drugs, Pharmacol. Rev., 15, 653 - 671.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., 1977;
Pharmakologie und Toxikologie, B. I., Wissenschaftsverlag Mannheim, 2. Auflage, 602 f.
- Gehring, P.J., Hammond, P.B., 1967;
The interrelationship between thallium and potassium in animals, J. Pharmacol. Exp. Therapeut., 155, 187 - 201.
- Gibson, J.E., Becker, B.A., 1970;
Placental transfer, embryotoxicity, and teratogenicity of thallium sulfate in normal and potassium-deficient rats, Toxicol. appl. Pharmacol., 16, 120 - 132.
- Gibson, J.E., Sigdestad, C.P., Becker, B.A., 1967;
Placental transport and distribution of Tl-204 sulfate in newborn rats and mice, Toxicol. appl. Pharmacol., 10, 408 (Abstr.).
- Givelber, H.M., DiPaolo, J.A., 1968;
Growth of explanted eight-day hamster embryos in circulating medium, Nature, 220, 1131 - 1132.
- Grobstein, C., 1950;
Behaviour of the mouse embryonic shield in plasma clot culture, J. Exp. Zool., 115, 297 - 314.
- Hall, B.K., 1972;
Achondroplasia in the embryonic chick: its potentiation by cortisone acetate and alleviation by vitamin C, Can. J. Zool., 50, 1527 - 1536.

- Hall, B.K., 1976;
Tl-induced achondroplasia in chicken embryos and the concept of critical periods during development, Teratology, 15, 1 - 16.
- Hsu, Y.-C., 1979;
In vitro development of individually cultured whole mouse embryos from blastocyst to early somite stage, Develop. Biol., 68, 453 - 461.
- Hsu, Y.-C., 1980;
Embryo growth and differentiation factors in embryonic sera of mammals, Develop. Biol., 76, 465 - 474.
- Hsu, Y.-C., 1981;
Regulation of mouse embryogenesis by exogenous growth factors, in : Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (D. Neubert, H.-J. Merker, eds.), pp. 83 - 96, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Jensh, R.P., Koszalka, T.R., Jensen, M., Biddle, L., Brent, R.L., 1977;
Morphologic alterations in the parietal yolk-sac of the rat from the 12th to the 19th day of gestation, J. Embryol. Exp. Morphol., 39, 9 - 21.
- Jolly, J., Lieure, C., 1938;
Recherches sur la culture des oeufs des mammifères, Archives d'Anatomie microscopique, 34, 307 - 374.
- Kao, J., Brown, N.A., Schmid, B., Goulding, E.H., Fabro, S., 1981;
Teratogenicity of valproic acid : in vivo and in vitro investigations, Teratogenes, Carcinogenes. a. Mutagenes., 1, 367 - 382.
- Karnofsky, D.A., Ridgeway, Patterson, 1950;
Production of achondroplasia in the chick embryo with Tl., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 73, 255 - 259.
- Kaufman, M.H., Steele, C.E., 1976;
Deleterious effect of an anaesthetic on cultured mammalian embryos, Nature, 260, 782 - 783.
- Klee-Trieschmann, U., Neubert, D., 1981;
Preliminary communication on the feasibility of culturing whole embryos in a chemically-defined medium, in : Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Differentiation and Toxicity (D. Neubert, H.-J. Merker, eds.), pp. 97 - 100, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Klein, N.W., Minghetti, P.P., Jackson, S.K., Vogler, M.A., 1978;
Serum protein depletion by cultured rat embryos, J. Exp. Zool., in press.
- Kröger, J., 1983;
Dissertation in Vorbereitung, FU - Berlin.

- Mirkes, P.E., Fantel, A.G., Greenaway, J.C., Shepard, T.H., 1981;
Teratogenicity of cyclophosphamide metabolites: Phosphor-
amide Mustard, Acrolein, and 4-Ketocyclophosphamide in rat
embryos cultured in vitro, Toxicol. appl. Pharmacol., 58, in
press.
- Morriss, G.M., Steele, C.E., 1977;
Comparison of the effects of retinol and retinoic acid on
postimplantation rat embryos in vitro, Teratology, 15, 109 - 120.
- Morriss, G.M., New, D.A.T., 1979;
Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial
neural folds and neural crest in cultured rat embryos, JEEM, 54,
17 - 35.
- Neubert, D., 1981;
On the Predictability of developmental toxicity - especially
prenatal toxicity - on the basis of culture experiments, in :
Culture Techniques, Applicability for Studies on Prenatal Diffe-
rentiation and Toxicity (D. Neubert, H.-J. Merker, eds.), pp. 567
- 583, Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Neubert, D., Barrach, H.-J., 1977a;
Significance of in vitro techniques for the evaluation of embryo-
toxic effects, in : Methods in Prenatal Toxicology, Evaluation of
Embryotoxic Effects in Experimental Animals (D. Neubert, H.-J.
Merker, T.E. Kwasigroch, eds.), pp. 202 - 210, Georg Thieme
Publ., Stuttgart.
- Neubert, D., Barrach, H.-J., 1977b;
Techniques applicable to study morphogenetic differentiation of
limb buds in organ culture, in : Methods in Prenatal Toxicology,
Evaluation of Embryotoxic effects in Experimental Animals (D.
Neubert, H.-J. Merker, T.E. Kwasigroch, eds.), pp. 241 - 251,
Georg Thieme Publ., Stuttgart.
- Neubert, D., Peters, H., Teske, S., Köhler, E., Barrach, H.-J., 1971;
Studies of the problem of aerobic glycolysis' occurring in mam-
malian embryos, Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Pharmakolo-
gie, 268, 235 - 241.
- New, D.A.T., 1966;
Development of rat embryos cultured in blood sera, J. Re-
prod. Fertil., 12, 509 - 524.
- New, D.A.T., 1967;
Development of explanted rat embryos in circulating medium,
J. Embryol. Exp. Morphol., 17, 513 - 525.
- New, D.A.T., 1978;
Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos
during organogenesis, Biol. Rev., 53, 81 - 122.

- New, D.A.T., Brent, R.L., 1972;
Effect of yolk-sac antibody on rat embryos grown in culture, J. Embryol. Exp. Morphol., 27, 543 - 553.
- New, D.A.T., Coppola, P.T., 1970a;
Effects of differred oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture, J. Reprod. Fertil., 21, 109 - 118.
- New, D.A.T., Coppola, P.T., 1970b;
Development of explanted rat fetuses in hyperbaric oxygen, Teratology, 3, 153 - 162.
- New, D.A.T., Coppola, P.T., Terry, S., 1973;
Culture of explanted rat embryos in rotating tubes, J. Reprod. Fertil., 35, 135 - 138.
- New, D.A.T., Coppola, P.T., Cockcroft, D.L., 1976;
Improved development of head-fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum, J. Reprod. Fertil., 48, 219 - 222.
- New, D.A.T., Coppola, P.T., 1977;
Development of a placental blood circulation in rat embryos in vitro, J. Embryol. Exp. Morphol., 37, 227 - 235.
- New, D.A.T., Daniel, J.C., 1969;
Cultivation of rat embryos explanted at 7.5 and 8.5 days of gestation, Nature, 223, 515 - 516.
- New, D.A.T., Mizell, M., 1972;
Opossum fetuses grown in culture, Science, 175, 533 - 535.
- New, D.A.T., Stein, K.F., 1964;
Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots, J. Embryol. Exp. Morphol., 12, 101 - 111.
- Nicholas, J.S., 1938;
The development of rat embryos in a circulating medium, Anatomical Record, 70, 199 - 210.
- Nicholas, J.S., Rudnick, D., 1934;
The development of rat embryos in tissue culture, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 20, 656 - 658.
- Otis, E.W., Brent, R.C., 1950;
Equivalent ages in mouse and human embryos, Anat. Rec. 120, 33 - 64.
- Robkin, M.A., Cockcroft, D.L., 1978;
The effect of carbon monoxide on glucose metabolism and growth of rat embryos, Teratology, 18, 337 - 342.

- Robkin, M.A., Shepard, T.H., Tanimura, T., 1972;
A new in vitro culture technique for rat embryos, Teratology, 5,
367 - 276.
- Rotter, W., 1978;
Störungen der Differenzierung und des Wachstums, in : Lehrbuch
der Pathologie, Band I, S. 102, F.K. Schattauer, Stuttgart - New
York.
- Shepard, T.H., Tanimura, T., Robkin M., 1969;
In vitro study of rat embryos, I. Effects of decreased oxygen on
embryonic heart rate, Teratology, 2, 107 - 100.
- Sim, F.R.P., Matsumoto, N., Goulding, E.H., Denny, K.H., Lamb, J., Keeler,
R.F., and Pratt, R.M., 1983;
Specific Craniofacial Defects Induced by Jervine in the Cultured
Rat Embryo, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 3,
111 - 121.
- Snell, G.D., 1941;
The early embryology of the mouse, Biology of the Laboratory
Mouse, pp. 1 - 54, London, Constable.
- Steele, C.E., 1972;
Improved development of "rat egg-cylinders" in vitro of a result
of fusion of the haert primordia, Nature New Biology, 237, 150 -
151.
- Steele, C.E., New, D.A.T., 1974;
Serum variants causing the formation of double hearts and other
abnormalities in explanted rat embryos, J. Embryol. Exp. Mor-
phol., 31, 707 - 719.
- Tamarin, A., Jones, K.W., 1968;
A circulating medium system permitting manipulation during
culture of postimplantation embryos, Acta Embryologica et Mor-
phologiae Experimentalis, 10, 288 - 301.
- Tanimura, T., Shepard, T.H., 1970;
Glucose metabolism by rat embryos in vitro, Proc. Soc. Exp.-
Biol. Med., 135, 51 - 53.
- Thews, G., 1977;
Atemgastransport und Säure-Basen-Status des Blutes, in : Phy-
siologie des Menschen (Schmidt, R.F., Thews, G., eds.), p. 491,
Springer, Berlin - Heidelberg - New York.
- Wessels, N.K., 1968;
Problems in the analysis of determination, mitosis and differen-
tiation, in : Epithelial-Mesenchymal-Interactions (Fleischmeajer,
R., Billingham, R.E., eds.), p. 132, Williams and Wilkens, Balti-
more.

Witschi, E., 1962;

Development : Rat, in : Growth, VII. Prenatal Vertebrate Development, Eds. Altman and Dittmer, Biological Handbooks of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Washington.

Yochim, J.M., Mitchell, J.A., 1968;

Intrauterine oxygen tension in the rat during progestation. Its possible relation to carbohydrate metabolism and the regulation of nidation, Endocrinology, 83, 706 - 713.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. D. NEUBERT danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Für die Hilfe bei der DNA- und Proteinbestimmung danke ich Frau Irmela BAUMANN-WILSCHKE und Herrn Dr. Ralf STAHLMANN.

Herrn Prof. Dr. R. HERKEN danke ich für die großzügig gewährte Unterstützung und die ständige Bereitschaft zur Hilfe.

Frau H. WOHLFEIL und Frau H. STÜRJE verdanke ich die mikroskopischen Präparate - herzlichen Dank!

LEBENS LAUF

- | | |
|------|--|
| 1953 | am 12. Januar in Nürnberg geboren |
| 1959 | Einschulung in Guxhagen/Kreis Melsungen |
| 1964 | Max-Planck-Gymnasium in Göttingen |
| 1971 | Abitur und Beginn der Apothekerpraktikantenzeit |
| 1973 | Vorexamen und Beginn des Pharmaziestudiums an der FU Berlin |
| 1977 | Staatsexamen im Fach Pharmazie und Beginn des Medizinstudiums an der FU Berlin |
| 1984 | Staatsexamen im Fach Medizin |

Für Julia und Tillmann

